



HAL
open science

De nouveaux biocatalyseurs hétérogènes pour des réactions d'oxydation : des cristaux de métalloenzymes artificielles

Sarah Lopez

► **To cite this version:**

Sarah Lopez. De nouveaux biocatalyseurs hétérogènes pour des réactions d'oxydation : des cristaux de métalloenzymes artificielles. Chimie organique. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV022 . tel-01989238

HAL Id: tel-01989238

<https://theses.hal.science/tel-01989238v1>

Submitted on 22 Jan 2019

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 COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Chimie inorganique et Bio inorganique

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Sarah LOPEZ

Thèse dirigée par **Caroline (EDCSV) MARCHI-DELAPIERRE**,
UGA

et codirigée par **Christine (CSV) CAVAZZA**, CEA

préparée au sein du **Laboratoire Laboratoire de Chimie et
Biologie des Métaux**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

De nouveaux biocatalyseurs hétérogènes pour des réactions d'oxydation : des cristaux de métalloenzymes artificielles

New heterogeneous biocatalysts for oxidation reactions: crystals of artificial metalloenzymes

Thèse soutenue publiquement le **12 octobre 2018**,
devant le jury composé de :

Monsieur JEAN-PIERRE MAHY

PROFESSEUR, UNIVERSITE PARIS-SUD, Rapporteur

Monsieur SYLVAIN CAILLOL

CHARGE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION LANGUEDOC-
ROUSSILLON, Rapporteur

Monsieur MARC FONTECAVE

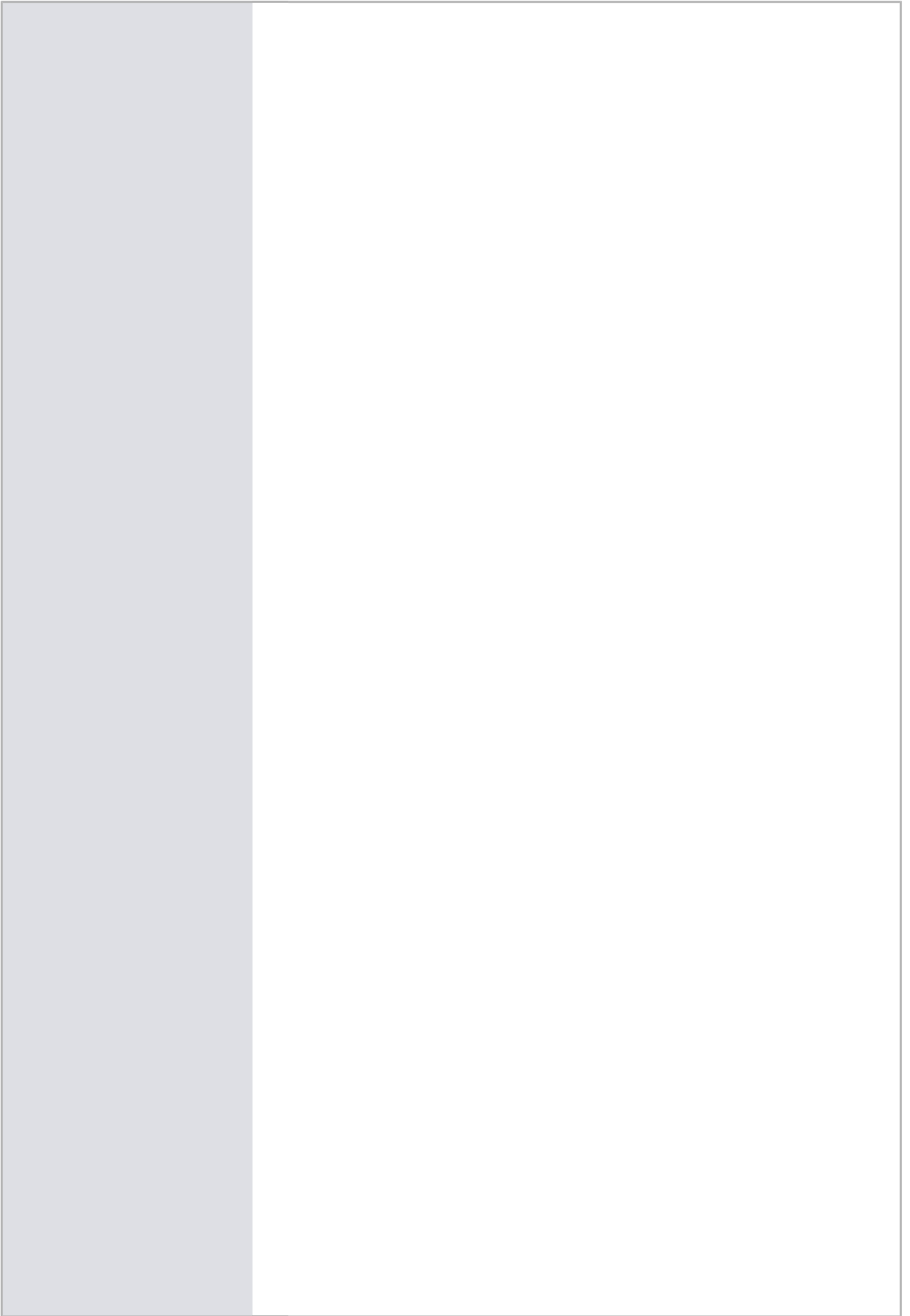
PROFESSEUR, COLLEGE DE FRANCE, Examineur

Madame CAROLE DUBOC

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION ALPES, Président

Madame CAROLINE MARCHI-DELAPIERRE

MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES,
Directeur de thèse



Remerciements

La thèse, quelle aventure ! Près d'un mois après ma soutenance et avec le recul nécessaire, je rédige enfin mes remerciements. La thèse a constitué certainement la plus grande expérience de ma vie et m'a permis de grandir aussi bien scientifiquement que personnellement. Aucune autre de mes futures expériences professionnelles ne sera aussi enrichissante et exigeante que celle vécue lors de ma thèse. Bien évidemment, rien de tout cela n'aurait pu être réalisable seule. C'est avec nostalgie que j'écris ces quelques lignes afin de remercier chacune des personnes présentes, de près ou de loin. J'espère n'oublier personne, si c'est le cas, s'il vous plaît, ne m'en tenez pas rigueur.

Dans un premier temps, je souhaite remercier mes trois directeurs de thèse, Stéphane Ménage, Christine Cavazza et Caroline Marchi-Delapierre. Bien qu'administrativement cela ne soit pas autorisé, il m'est impossible de nommer l'un d'entre eux autrement. Pour commencer, Stéphane, bien que ton travail de directeur de laboratoire t'ait énormément occupé lors de mes trois années de thèse, tu as été un véritable moteur pour notre projet. Peu importe les aléas du laboratoire, ta motivation a été sans faille pour me pousser à me surpasser. Même si tu n'as pas le titre officiel de directeur de thèse, le rôle que tu as joué est, de loin, l'un des plus importants. Toutes nos discussions scientifiques, nos débats, nos idées, nos désaccords ont fait du projet ce qu'il est aujourd'hui. Sans toi, rien de tout cela n'aurait été possible et je te remercie sincèrement pour tout ce que tu m'as appris que ce soit scientifiquement ou personnellement. Même si je tiens à préciser que de casser la porte du bureau ou de me demander 487 fois par jour où en était l'avancement des manips pouvaient être quelque fois un poil compliqué à gérer. Mais c'est aussi cela qui fait de toi ce que tu es et finalement nos caractères ne sont pas si éloignés. En résumé, tu es un chef au grand cœur qui a su me booster avec sa motivation et qui a su me transmettre son envie de faire avancer la science malgré les difficultés du système actuel. Ta complémentarité avec Carro m'a permis d'apprendre différentes facettes de la chimie toutes aussi intéressantes les unes que les autres. Carro, je souhaite te remercier sincèrement aussi. Tu as été présente du début à la fin et tu as su répondre à mes nombreuses interrogations tout au long de cette thèse. Si je devais citer tes principales qualités, ce serait ta grande pédagogie, ta patience sans limite et, surtout, ton aide précieuse dans l'un des exercices que j'apprécie le moins... les présentations ! Au fil du temps, j'ai su prendre de l'assurance et contenir mon stress me permettant finalement d'atteindre un de mes objectifs : réaliser une belle présentation pour ma soutenance de thèse.

Remerciements

De plus, tu as su apaiser les (quelques) tensions présentes entre deux caractères assez similaires qui sont celui de Stéphane et le mien. Je pense que ce rôle a été vraiment primordial pour le bon déroulement de ma thèse et je t'en remercie. Finalement, tu vois que les tampons ne sont pas utiles qu'aux biochimistes. Christine, tant de choses à dire sur toi ! Qui l'aurait cru que nous partagerions tant de choses toutes les deux, toi qui as failli ne pas être ma directrice de thèse. Finalement, on peut dire que tu as pris la bonne décision ! Je n'oublierai jamais tous les moments que nous avons partagés ensemble durant ma thèse : les heures passées en cristallographie, dans nos réunions préférées sur les CLECs, en congrès ou encore celles passées certains soirs et week-ends au synchrotron (sans compter nos McDo et restaurants en tout genre). Grâce à toi, je ne me suis pas enrichie que scientifiquement. Tu m'as aidée à m'épanouir personnellement et, mine de rien, y'avait un peu de travail à faire. Et finalement, après toutes ces années, on a développé bien plus qu'une relation professionnelle et j'espère que ce sera le cas encore longtemps. Si je n'avais qu'un seul conseil à te donner : ne laisse pas certaines personnes t'atteindre, tu sais ce que tu vauds, tu n'as rien à leur prouver. Une dernière chose pour tous les trois : même si certains d'entre vous ont été « légèrement » déçus par mon choix professionnel, je vous assure que je suis très heureuse et épanouie comme cela ☺.

Dans un deuxième temps, j'aimerais remercier mes compagnons de bureau qui m'ont supportée durant ces trois années de thèse. Vous avez été une aide psychologique précieuse, en particulier, pendant la rédaction. Sans un bureau comme celui-ci, l'ambiance au travail aurait été vraiment moins agréable et il aurait été très difficile de finir cette thèse sans avoir un gros pet au casque. D'ailleurs, nous avons pu observer ce que ça a donné sur d'autres personnes... On a vraiment passé des moments formidables et, souvent, cela me manque. Lulu, je te donne tout le reste de mon courage pour finir « en forme » cette thèse. Désolée de ne pas être là mais ne t'inquiètes pas, je ne suis jamais vraiment loin de toi. Continue de râler comme tu le fais si bien et n'oublies pas de me raconter tous les potins du labo, ça nous donne tellement de baume au cœur. Jojo, après nos révisions du master, notre stage de M2 et notre thèse, nous voilà tous les deux diplômés ! Comme quoi, il donne vraiment ce diplôme à n'importe qui. Je te souhaite le meilleur pour la suite, en espérant que tu trouveras ton équilibre en Montagne(s)/Femme(s)/Boulot(s) (dans l'ordre que tu préfères). Les Docteurs ne sont pas si mal vus en entreprise finalement.

Pour la suite, je remercie mes compagnons d'équipe « Métalloenzymes artificielles » : Laurianne, Chloé, Alex, Marina et Adeline. Laurianne, nous nous sommes rencontrées

Remerciements

lorsque tu étais en deuxième année de thèse. C'est toi qui m'as fait découvrir ce très beau projet dans lequel j'ai choisi de m'investir depuis mon stage de M1. Tu as été ma plus grande formatrice avec beaucoup de patience et de pédagogie. Mais avant tout, on a su développer une réelle amitié qui nous lie maintenant depuis plusieurs années. Je te souhaite évidemment le meilleur dans ta nouvelle vie, preuve qu'il n'y a pas que la recherche qui rend heureux après une thèse. Tous ensemble, nous avons formé une super équipe venant d'univers très différents que ce soit scientifiquement (Chimie vs Biochimie), géographiquement (Paris vs la « province ») ou même dans le mode de fonctionnement. Je n'oublierai jamais tous nos moments que ce soit nos nombreuses discussions entre deux paillasses, nos fameux goûters tant attendus tout au long de la journée, nos réunions interminables où certains se permettent d'utiliser des mots bien trop littéraires dans un tel contexte ou encore toutes nos soirées après labo qui nous ont certainement permis de survivre à certaines journées difficiles. Merci à tous, merci pour tout, nous sommes maintenant devenus bien plus que de simples collègues de boulot.

Je souhaite remercier tous mes collaborateurs qui ont partagé leur connaissance et leur expérience avec moi, en particulier, Véronique et Pierre-Yves. Merci à vous deux même si le projet NikA-cuivre n'a pas donné les résultats escomptés grâce à vous, j'ai pu réaliser cette thèse qui me tenait réellement à cœur. Je n'oublie pas mes autres collaborateurs, Serge C., Patrice, Elizabetta ou encore Nicolai avec lesquels mes différents projets ont pu atteindre une nouvelle dimension.

Je n'oublie pas mes autres « non permanents » préférés Jaione, Marila, Nathan ou encore Steve avec qui j'ai partagés tant de bons moments, tant de discussions (scientifiques ou autres), tant de rigolades, toutes ces choses qui m'ont permis d'apprécier pleinement mes années passées au sein de ce laboratoire.

Encore tellement de personnes à remercier... Un grand merci au reste de l'équipe BioCE, permanents ou non, Olivier, Stéphane T. ou encore Johannes pour tous les moments partagés. Je vous souhaite le meilleur pour la suite en espérant que, pour certains, le monde de la recherche publique n'aura pas raison de votre motivation des débuts. Merci à tous autres chimistes ou biochimistes du labo, Murielle, Vincent, Christian, Hamid, Victor, Jenny ou encore Adina pour ne citer qu'eux. J'oublie certainement de nombreuses personnes et si c'est le cas, j'espère que vous ne m'en tiendrez pas rigueur.

Sommaire

<i>Abréviations</i>	13
<i>Introduction générale</i>	17
<i>Chapitre I : Introduction bibliographique</i>	22
1. Les oxygénases et les oxydases comme source d'inspiration	22
1-1. Les systèmes hémiques de type cytochrome P450	23
1-2. Les enzymes à fer non hémique	26
1-2-1. Les enzymes dinucléaires de fer non hémique : le cas de la méthane monooxygénase	26
1-2-2. Les systèmes mononucléaires de fer non hémique	28
1-2-2-1. Les catéchol dioxygénases	30
1-2-2-2. Les dioxygénases de Rieske	31
1-3. Les enzymes à cuivre	33
1-3-1. Les monooxygénases	34
1-3-2. Les oxydases	34
1-4. Conclusion	35
2. Les complexes bio-inspirés	37
2-1. Les complexes de fer bio-inspirés activant O ₂	37
2-2. Les complexes bio-inspirés à fer activant H ₂ O ₂	40
2-3. Conclusion	44
3. Les métalloenzymes artificielles	45
3-1. Concept général	45
3-2. Conception de métalloenzymes artificielles	46
3-2-1. Choix de la biomolécule	46
3-2-2. Stratégies d'ancrage	47
3-2-2-1. Ancrage covalent	48
3-2-2-2. Insertion dative	50
3-2-2-3. Substitution d'un ion métallique	50
3-2-2-4. Interaction supramoléculaire	52
3-3. Réactions d'oxydation avec les métalloenzymes artificielles	54
3-3-1. Sulfoxydation	54
3-3-1-1. Sulfoxydases à base de myoglobine : comparaison des hybrides à base de chrome ou de manganèse	55
3-3-1-2. Sulfoxydase à base de streptavidine	58

3-3-1-3. Sulfoxydase à base de BSA/HSA	58
3-3-1-4. Sulfoxydase à base de NikA	62
3-3-1-5. Sulfoxydase à base d'anticorps	63
3-3-1-6. Conclusion	65
3-3-2. Epoxydation	66
3-4. Optimisation des métalloenzymes artificielles par évolution dirigée	68
3-4-1. Optimisation de la streptavidine	68
3-4-2. Vers une métalloenzyme artificielle avec des cinétiques comparables aux enzymes natives	69
3-4-3. Optimisation de métalloenzymes artificielles pour la réaction de métathèse <i>in vivo</i>	71
3-5. Conclusion	72
4. L'immobilisation d'enzymes	73
4-1. L'immobilisation sur surface	73
4-1-1. Adsorption	73
4-1-2. Liaisons covalentes	74
4-2. Encapsulation	75
4-3. L'inclusion	76
4-4. Réticulation d'enzymes	77
4-4-1. CLEA	78
4-4-2. CLEC	79
4-5. Conclusion	80
5. Chimie tandem	82
5-1. Cascades multi-étapes réalisées par des catalyseurs chimiques	83
5-2. Cascades multi-étapes réalisées par des enzymes	85
5-3. Cascades multi-étapes en combinant les catalyses enzymatiques et homogènes	88
5-4. Conclusion	91
6. Description de mon projet de thèse	92
Chapitre II : Conception de nouvelles métalloenzymes artificielles pour l'oxydation	105
1. Conception d'une nouvelle métalloenzyme artificielle pour l'oxydation d'alcools	105
1-1. Introduction	105
1-2. Evaluation des conditions réactionnelles	108
1-2-1. Passage en milieu aqueux	108
1-2-2. Variations des différents composants du système catalytique	110
1-2-3. Mise à l'échelle pour le passage en milieu protéique	112
1-3. Caractérisation et tests de réactivité de l'hybride HSA/Cu	113
1-3-1. Caractérisation de l'hybride	113
1-3-2. Tests catalytiques en présence de la protéine HSA	114

1-4. Caractérisations et tests de réactivité de l'hybride NikA/Cu	115
1-5. Conclusion	117
2. Conception d'une nouvelle métalloenzyme artificielle pour l'hydroxychloration d'alcènes	118
2-1. Introduction	118
2-2. Synthèse et caractérisations de l'hybride NikA/Ru-bpza	119
2-2-1. Synthèse et caractérisations du complexe Ru-bpza	120
2-2-1-1. Structure cristallographique	120
2-2-1-2. Spectroscopie infrarouge	121
2-2-1-3. Spectrométrie de masse	121
2-2-2. Synthèse et caractérisations de l'hybride NikA/Ru-bpza	122
2-2-2-1. Structure cristallographique de l'hybride	122
2-2-2-2. Spectroscopie infrarouge	123
2-2-2-3. Spectrométrie de masse	124
2-2-2-4. Conclusion	124
2-3. Propriétés catalytiques	125
2-3-1. Premiers tests catalytiques avec l'hybride NikA/Ru-bpza.	125
2-3-2. Expansion de la gamme de substrat	127
2-3-3. Etude de la stabilité de la protéine vis-à-vis de PIDA	129
2-4. Mécanisme réactionnel	130
2-4-1. Addition électrophile	130
2-4-2. Recherche des intermédiaires réactionnels	131
2-4-3. Recherche de l'espèce oxydante	134
2-5. Conclusion	138
Références	140
Chapitre III : Développement d'une biocatalyse hétérogène	143
1. Introduction	143
2. Préparation et caractérisation des cristaux NikA/Fe-Lx	145
2-1. Contexte	145
2-2. Synthèse des ligands	147
2-2-1. Synthèse du ligand L2	147
2-2-2. Synthèse du ligand LIII	150
2-3. Synthèse des complexes	152
2-3-1. Synthèse du complexe Fe-L2	152
2-3-2. Synthèse du complexe Fe-LIII	152
2-4. Caractérisations des complexes	152
2-4-1. Caractérisation par spectrométrie de masse ESI	152

2-4-2. Caractérisation par spectroscopie d'absorption UV-Visible	153
2-5. Préparation et caractérisation des cristaux de NikA/Fe-Lx	154
2-5-1. Préparation des cristaux de NikA/Fe-Lx	154
2-5-2. Détermination des structures cristallographiques	154
2-5-3. Réactivité <i>in crystallo</i> des cristaux et NikA/Fe-L2	156
3. Mise en place des conditions de réticulation et caractérisations des systèmes	157
3-1. Variations des tampons de cristallisation	157
3-2. Variations de la concentration en glutaraldéhyde	158
3-3. Optimisation du temps de réticulation vis-à-vis du NaOCl	159
3-4. Caractérisations des CLEC NikA/Fe-Lx	161
3-4-1. Dosage en protéine et en fer	161
3-4-2. Cristallographie par diffraction aux rayons X	162
3-4-3. Fluorescence X	163
4. Réactivité sulfoxydation des CLEC NikA/Fe-LIII	164
4-1. Transposition de la réactivité de sulfoxydation des hybrides en solution à la catalyse hétérogène	164
4-2. Expansion de la gamme de substrats	168
4-3. Etude de stabilité des CLEC NikA/Fe-LIII	169
4-4. Conclusion	172
5. Réactivité d'hydroxychloration d'alcènes	173
5-1. Recherche d'une nouvelle réactivité	173
5-2. Développement du système	176
5-2-1. Expansion de la gamme de substrats	176
5-2-2. Etudes de stabilité des CLEC NikA/Fe-Lx	178
5-3. Etude du mécanisme réactionnel	184
5-4. Conclusion	190
6. Réactivité d'oxydation avec O₂	192
6-1. Oxydation du β-méthoxystyrène avec O ₂	192
6-1-1. Comparaison de l'activité catalytique des CLEC NikA/Fe-L2, de l'hybride NikA/Fe-L2 en solution et du complexe Fe-L2 en solution	192
6-1-2. Etudes cinétiques des CLEC NikA/Fe-L2	194
6-1-3. Comparaison de la stabilité des CLEC NikA/Fe-L2 vs l'hybride NikA/Fe-L2 en solution et le complexe Fe-L2 en solution	196
6-1-4. Comparaison des stabilités des CLEC NikA/Fe-Lx (x = 0, 1 ou 2)	198
6-2. Expansion de la gamme de substrats	200
6-3. Mécanisme réactionnel	202
6-4. Conclusion	209
7. Conclusion générale	209

Chapitre IV : Vers une chimie tandem	215
1. Introduction	215
2. Développement de la réaction tandem coupure oxydante/sulfoxydation.	216
2-1. Développement d'une réactivité de sulfoxydation en présence d'H ₂ O ₂ et des CLEC	217
2-2. Mise au point de la réaction tandem	218
2-3. Conclusion	224
3. Développement de la deuxième réaction tandem	225
3-1. Optimisation de la réaction de couplage	225
3-2. Optimisation de la réaction de sulfoxydation	231
3-3. Combinaison des deux réactivités : développement de la chimie tandem	235
3-4. Conclusion	240
4. Conclusion générale	241
Conclusion générale	244
Partie Expérimentale	251
1. Procédures générales	251
2. Métalloenzyme artificielle à base de cuivre	256
2-1. UV-visible du système catalytique Cu/bipyridine en présence de la protéine HSA	256
2-2. Procédures catalytiques	256
2-2-1. Procédure standard de référence d'activation d'O ₂	256
2-2-2. Procédure générale d'activation d'O ₂ en milieu aqueux	257
2-2-3. Procédure générale d'activation d'O ₂ en présence d'HSA	257
3. Métalloenzyme artificielle à base de ruthénium	258
3-1. Synthèse	258
3-1-1. Synthèse du complexe Ru(bpza)Cl(CO) ₂ ⁹	258
3-1-2. Synthèse des chlorhydrines de référence	259
3-1-3. Synthèse des époxydes de référence	263
3-1-4. Synthèse du complexe Mg(EDTA)	264
3-2. Préparation, purification et caractérisation des hybrides	265
3-2-1. Préparation et purification de l'hybride NikA/Ru-bpza	265
3-2-2. Caractérisation de l'hybride NikA/Ru(bpza)	265
3-3. Procédures catalytiques	266
3-3-1. Procédure générale pour l'oxychloration d'alcènes avec l'hybride NikA/Ru(bpza) purifié	266
3-3-2. Procédure générale pour l'oxychloration d'alcènes avec l'hybride NikA/Ru(bpza) préparé in situ	267
4. Réactivité sulfoxydation par les CLEC	268

4-1. Synthèse	268
4-1-1. Synthèse des substrats thioéthers	268
4-1-2. Synthèse des sulfoxydes références	272
4-1-3. Synthèse du ligand N ₂ Py ₂	275
4-1-4. Synthèse du complexe Fe-LIII	278
4-2. Préparation des CLEC NikA/Fe-N ₂ Py ₂	278
4-3. Procédure générale de sulfoxydation des thioéthers avec les CLEC NikA/Fe-N ₂ Py ₂	279
5. Réactivité d'hydroxychloration par les CLEC	280
5-1. Synthèse	280
5-1-1. Synthèse des ligands L1 et L2 ¹²	280
5-1-2. Synthèse des complexes Fe-L1 et Fe-L2 ¹²	284
5-1-3. Synthèse du 1-chloro-2-phénylpropène – Produit de la déshydratation du 1-chloro-2-phénylpropan-2-ol.	284
5-1-4. Synthèse des produits dichlorés	285
5-2. Préparation, purification et caractérisation des CLEC	286
5-2-1. Purification, cristallisation et synthèse des CLEC NikA/Fe-L _x ou CLEC NikA/Ni-EDTA (x = 0, 1 ou 2)	286
5-2-2. Dosage de la protéine NikA dans les cristaux avant réticulation	287
5-2-3. Quantification de la quantité de fer dans les cristaux après réticulation ¹⁶	288
5-2-4. Concentration finale de catalyseur	288
5-3. Procédures catalytiques	288
5-3-1. Procédure générale d'oxychloration d'alcènes en présence de KHSO ₅ et de NaCl	288
5-3-2. Procédure générale pour la catalyse d'oxydation de l' α -méthylstyrène avec différents oxydants	289
5-3-3. Expériences de stabilité avec les CLEC NikA/Fe-L _x	289
5-3-4. Oxychloration d'alcènes en présence de DMPO	289
5-3-5. Variations expérimentales pour l'oxychloration d'alcènes avec les CLEC NikA/Fe-L _x	290
5-3-6. Expériences de RPE	290
6. Réactivité activation d'O₂ par les CLEC	291
6-1. Caractérisation des références	291
6-2. Procédures catalytiques	292
6-2-1. Procédure générale d'activation d'O ₂ par les CLEC	292
6-2-2. Suivi UV-Visible de la réduction du complexe Fe-L2 en conditions anaérobies	292
7. Réactivité tandem	293
7-1. Synthèse	293
7-1-1. Synthèse des complexes VO-L4 et V-L5	293
7-1-1-1. Synthèse des ligands L4 et L5 ¹⁸	293
7-1-1-2. Préparation des solutions stocks de complexe VO-L4, VO-L5, Fe-L4 et Fe-L5	294
7-1-2. Synthèse des substrats thioéthers	294

7-1-2-1. Les composés thioéthers substrats de motif de base 4-vinylthiobenzyléther _____	294
7-1-2-2. Les composés thioéthers (références pour la réaction de couplage) _____	297
7-1-3. Synthèse des références avec le motif 4-carboxyaldehydethiobenzyléther _____	300
7-1-4. Synthèse des alcools _____	303
7-1-5. Synthèse des sulfoxydes de référence _____	304
7-1-5-1. Les composés sulfoxydes pour la réaction tandem de coupure oxydante _____	304
7-1-5-2. Les composés sulfoxydes pour la réaction de couplage _____	307
7-1-5-3. Synthèse des sulfoxydes/aldehydes _____	309
7-2. Procédures catalytiques _____	309
7-2-1. Procédure générale pour la catalyse de coupure oxydante des alcènes en présence de DTT ____	309
7-2-2. Procédure générale pour la réaction de couplage alcène/thiol _____	310
7-2-3. Procédure générale pour la catalyse de sulfoxydation des thioéthers en présence d'H ₂ O ₂ et des complexes VO-L4 _____	311
7-2-4. Procédure générale pour la catalyse tandem (coupure oxydante + sulfoxydation) des substrats n°9 en présence de DTT et d'H ₂ O ₂ _____	311
7-2-5. Procédure générale pour la catalyse tandem (couplage + sulfoxydation) des substrats n°10 en présence de thiophénol et d'H ₂ O ₂ _____	311

Abréviations

(DHQD)₂PHAL	1,4-bis(9- <i>O</i> -dihydroquinidinyl)phtalazine
ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribose nucléotide
AlaDH	alanine déshydrogénase
ALBP	protéine liant les lipides adipocytes
ALDH	aldéhyde déshydrogénase
AMO	alcène monooxygénase
APSi	capsule hybride à base alginate/protamine/silice
ATHase	Hydrogénase
Bipy	Bipyridine
Bpg	<i>bis</i> (2-pyridylméthylglycine)
BphC	2,3-dihydroxybiphényl-1,2-dioxygénase
BSA	albumine sérique bovine
CAR	acide carboxylique réductase
CAS	clavamate synthase
CAT	Catalase
CLEA	agrégats d'enzymes réticulés
CLEC	cristaux d'enzymes réticulés
CPR	cytochrome P450 réductase
Cu(I)	iodure de cuivre
Cu(OTf)	iodure de triflate
Cyt. P450	cytochrome P450
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DAOCS	déacétoxycéphalosporine C synthase
DBU	diazabicycloundécène
DIPEA	diisopropyléthylamine
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylènediaminetétraacétique
ee	excès énantiomérique
EH	époxyde hydrolase
EP	Epoxydase
FePc	complexe de fer avec un ligand porphycène
GluDH	glutamate déshydrogénase

GO	galactose oxydase
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
Hbpza	acide <i>bis</i> -(pyrazol-1-yl)acétique
HCA	anhydrase carbonique humaine
HO	2-hydroxy-acide oxydase
HPCD	homoprotocatéchuate-2,3-dioxygénase
HRP	peroxydase du raifort
HSA	albumine sérique humaine
IPNS	synthétase N d'isopénicilline
IRED	imine réductase
KOH	Potasse
LDH	hydroxyde double lamellaire
MAO-N	monoamine oxydase
Mb	myoglobine
MMO	méthane monooxygénase
N₄Py	<i>N,N-bis</i> (2-pyridylméthyl)- <i>N-bis</i> (2-pyridyl)méthylamine
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaOCl	hypochlorite de sodium
NDO	naphtalène 1,2-dioxygénase
NMI	1-méthylimidazole
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
NMO	<i>N</i> --méthylmorpholine <i>N</i> -oxyde
Phen	phénanthroline
PhIO	iodosylbenzène
PIDA	diacétate d'iodobenzène
PIX	porphyrine IX
PMO	polysaccharide monooxygénase
Sav	streptavidine
SMO	styrène monooxygénase
SPAAC	cyclo-additions azide-alcyne activées par contrainte
Tampon HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Tampon Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TauD	taurine/ α -KG-dioxygénase
TBN	nitrile de <i>tert</i> -butyle
TMC	1,4,8,11-tétraméthyl-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane

TON	nombre de cycles catalytiques
XLnA	xylanase 10A
YLL	lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i>
α-KG	α -cétoglutarate
α-TA	α -transaminase
ω-TA	ω -transaminase

Introduction générale

Depuis la révolution industrielle, la chimie ne cesse de prospérer en développant des procédés de plus en plus performants nécessaires aux besoins grandissants de la société. En effet, la chimie est omniprésente dans notre quotidien et a un rôle primordial dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques, pétrochimiques ou encore agroalimentaires. Cependant, de nombreux procédés chimiques ont été développés aux dépens de l'environnement, engendrant des désastres écologiques. Par exemple, les réactions d'oxydation sont, encore aujourd'hui, réalisées dans des conditions drastiques, à des températures et pressions très élevées ou en utilisant des métaux nobles très onéreux, toxiques et peu abondants.

Face à la forte croissance de la population mondiale et à l'épuisement des combustibles fossiles, le concept de chimie verte a été introduit par Anastas et Warner,¹ dans les années 1990, préconisant douze principes permettant de développer une chimie plus respectueuse de l'environnement. Désormais, les défis scientifiques sont portés :

- sur la limitation de la pollution à la source en réduisant l'utilisation de produits dérivés, tels que les groupements protecteurs, en développant des synthèses plus économes en termes d'énergie ou d'atomes,
- sur la diminution de la toxicité des réactions chimiques en utilisant des produits et solvants moins toxiques,
- sur l'utilisation de ressources renouvelables ou biodégradables limitant les dépenses énergétiques,
- sur le développement de catalyseurs permettant de développer des procédés plus économes et moins dangereux.

A titre d'exemple, nous pouvons citer la production d'ibuprofène par la société BHC qui a remplacé le procédé Boots développé dans les années 1960. Le procédé Boots nécessitait une synthèse très longue et produisait de nombreux sous-produits réactionnels.²

De nombreuses investigations ont donc été focalisées sur le développement de procédés catalytiques d'oxydation efficaces, propres et stables.^{3, 4} Plus particulièrement, l'oxydation d'alcènes et la sulfoxydation de thioéthers constituent des réactions clés dans de nombreuses synthèses de médicaments comme, par exemple, dans la production de l'Atazanavir (agent antiviral) ou l'Oméprazole (utilisé dans le traitement de l'ulcère gastrique) (**Figure I-1**).⁵

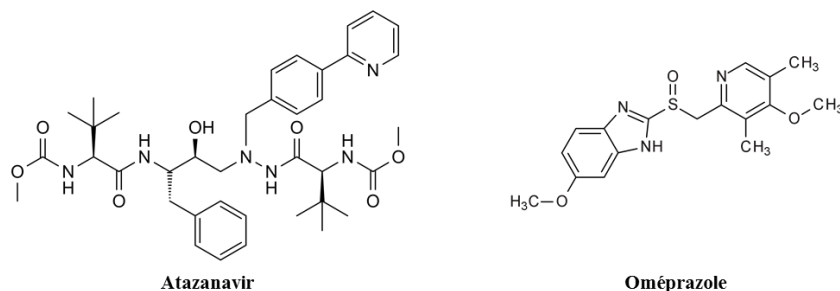


Figure I-1 : Molécules d'Atazanavir (à gauche) et d'Oméprazole (à droite).

Afin de concevoir ces nouveaux catalyseurs innovants, une des solutions envisagées est de s'inspirer d'un modèle universel, la Nature. En effet, des procédés naturels, ayant peu d'impact sur l'environnement, réalisent des réactions chimiques de manière très efficace et très sélective en utilisant principalement des ressources abondantes sur la Terre, comme l'eau, le dioxygène ou encore le fer. Dans ce cadre, le concept et de bioinspiration propose de créer de nouveaux matériaux et de nouvelles structures moléculaires en s'inspirant de la Nature.⁶⁻⁸ La compréhension et l'inspiration des systèmes naturels a déjà permis à l'être humain de développer des technologies extraordinaires comme, par exemple, les ailes des avions qui sont inspirées des rapaces ou encore des médicaments délivrés dans les cellules avec l'efficacité d'un virus (Figure I-2).

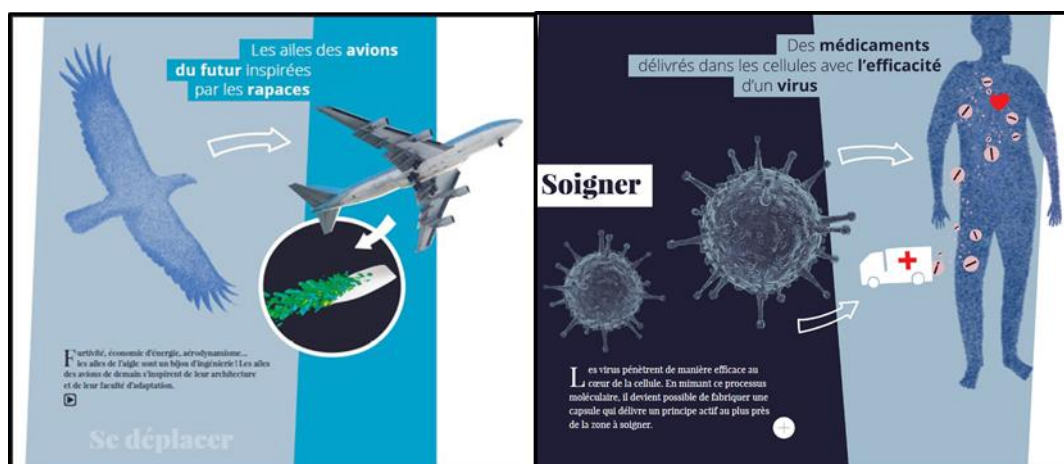


Figure I-2 : Exemples de bio-inspiration.

Dans ce cadre, s'inspirer des enzymes constitue une approche intéressante pour la réalisation de procédés d'oxydation éco-compatibles et, plus particulièrement, les métalloenzymes de type oxygénase paraissent être de bonnes sources d'inspiration.^{9, 10} Elles sont capables

d'activer l'oxygène moléculaire afin de réaliser un transfert d'un ou deux atomes d'oxygène sur un substrat exogène et en réalisant plusieurs milliers de cycles catalytiques.

De nombreuses équipes de chercheurs à travers le monde ont donc décidé de s'inspirer de ces enzymes afin de concevoir de nouveaux biocatalyseurs hybrides mimant leur activité : les oxygénases artificielles.¹¹ Celles-ci permettent de combiner les avantages des deux mondes de la biocatalyse et de la catalyse homogène. Les biocatalyseurs naturels possèdent une efficacité et une sélectivité remarquables grâce à l'influence de la seconde sphère de coordination (les acides aminés du site actif de l'enzyme). De plus, les réactions sont réalisées en milieu aqueux, à température ambiante et à pression atmosphérique, conditions requises pour le développement d'une chimie durable. Par complémentarité, les catalyseurs homogènes sont très facilement modulables, que ce soit au niveau du ligand ou vis-à-vis de l'ion métallique. Une autre caractéristique de ces catalyseurs est la possibilité de réaliser une infinité de réactions, naturelles ou non, sur une infinité de substrats différents.

Malheureusement, l'utilisation des biocatalyseurs artificiels au niveau industriel est encore limitée, surtout en conditions oxydantes, en raison de leur manque de stabilité. Pour y remédier, l'introduction de la catalyse hétérogène semble être une solution viable. En effet, celle-ci permet d'avoir des systèmes catalytiques beaucoup plus stables que des catalyseurs homogènes ou enzymatiques. De plus, les catalyseurs hétérogènes peuvent être facilement séparés du milieu réactionnel et recyclés de nombreuses fois sans perdre en efficacité, et peuvent opérer dans une large gamme de conditions réactionnelles. La conception de métalloenzymes artificielles hétérogènes peut être effectuée *via* diverses techniques d'immobilisations d'enzymes.¹² Lors de mes travaux de doctorat, la synthèse de métalloenzymes artificielles hétérogènes a été réalisée en deux étapes : d'abord, la cristallisation des hybrides, suivie de leur stabilisation par l'intermédiaire de la technologie CLEC (Cross-Linked Enzyme Crystals). Après leur synthèse, ces biocatalyseurs hétérogènes ont été testés en catalyse d'oxydation hétérogène sur différentes réactivités. Ces nouveaux catalyseurs bio-inspirés ont pour but d'allier les avantages des catalyses enzymatique (sélectivité et efficacité), homogène (diversité) et hétérogène (stabilité et recyclabilité).

Ce manuscrit comprendra quatre chapitres : (I) introduction bibliographique, (II) conception de nouvelles métalloenzymes artificielles pour l'oxydation, (III) développement d'une biocatalyse hétérogène et (IV) vers une chimie tandem. L'introduction bibliographique présentera quelques exemples d'oxygénases à fer et à cuivre existantes dans la Nature puis

suivra un état de l'art sur la conception des métalloenzymes artificielles ainsi que leurs performances catalytiques dans différentes réactions d'oxydation. Les différentes techniques d'immobilisations d'enzymes seront ensuite présentées avec un intérêt plus marqué pour la réticulation d'enzymes. Pour finir, la chimie tandem (ou chimie cascade) sera présentée dans le cadre de réactions d'oxydation. Le deuxième chapitre présentera la conception et la caractérisation de deux nouvelles oxygénases artificielles en solution, l'une à base de cuivre pour l'oxydation de l'alcool benzylique et l'autre à base de ruthénium pour l'hydroxychloration d'alcènes. Le troisième chapitre sera la description de la mise en place de la méthodologie d'immobilisation d'enzymes à nos métalloenzymes artificielles, leurs caractérisations ainsi que leurs études en catalyse d'oxydation hétérogène. Le quatrième chapitre retranscrira les travaux réalisés pour le développement d'une chimie d'oxydation tandem en comparant les catalyseurs en solution et les catalyseurs hétérogènes.

Chapitre I

Chapitre I : Introduction bibliographique

L'oxygène moléculaire (O_2) est omniprésent dans la vie d'une écrasante majorité des organismes vivants (bactéries, plantes, mammifères). Cette molécule possède deux fonctions essentielles : un rôle d'accepteur terminal d'électrons dans la chaîne respiratoire et un rôle de réactif biosynthétique pour l'oxydation de composés chimiquement inertes, tels que des alcanes, des alcènes ou encore des substrats organiques aromatiques. L'oxydation de ces substrats constitue une étape clé dans de nombreux processus biologiques (dégradation des xénobiotiques, biosynthèse de briques moléculaires tels que l'ADN, les acides aminés, etc...). Cependant, les réactions entre ces substrats organiques et O_2 sont cinétiquement défavorables. Dans ce cadre, il existe des systèmes naturels capables d'activer la molécule d' O_2 par coordination de celle-ci avec un métal ou par réaction directe avec un radical. De nombreux chercheurs se sont donc évertués à comprendre le fonctionnement des oxygénases et/ou oxydases pour s'en inspirer afin de développer de nouvelles méthodologies de synthèse efficaces et plus respectueuses de l'environnement pour diverses réactions d'oxydation. Dans cette première partie d'introduction bibliographique, quelques exemples d'oxygénases à fer et d'oxygénases ou d'oxydases à cuivre seront abordés.

1. Les oxygénases et les oxydases comme source d'inspiration

Les oxygénases et les oxydases sont donc des enzymes extrêmement performantes capables d'activer O_2 pour réaliser une très grande variété de réactions d'oxydation. Une oxydase est une enzyme capable d'oxyder un substrat organique sans l'insertion d'atomes d'oxygène.¹³ Une oxygénase est une enzyme capable d'insérer un (monooxygénase) ou deux (dioxygénases) atomes d'oxygène dans un substrat de manière efficace, en conditions très douces et avec une très grande sélectivité.¹⁴ Elles peuvent être classées en deux catégories distinctes : les enzymes hémiques et non hémiques. Bien que toutes ces enzymes possèdent de nombreuses différences au niveau de leurs structures, l'activation de O_2 par un centre à fer ou à cuivre passe par le même type d'intermédiaire réactionnel, c'est-à-dire une espèce métallique à haut degré d'oxydation (**Figure I-3**).¹⁵

Les premières oxygénases furent découvertes en 1955 par O. Hayaishi, avec l'identification d'une enzyme, la pyrocatechase, capable de catalyser la conversion du catéchol en acide

muconique par coupure oxydante,¹⁰ démontrant la capacité d'une enzyme à incorporer de l'oxygène moléculaire au sein d'une liaison C-H d'un substrat. De nombreuses investigations ont donc été réalisées par les chercheurs ces dernières décennies.

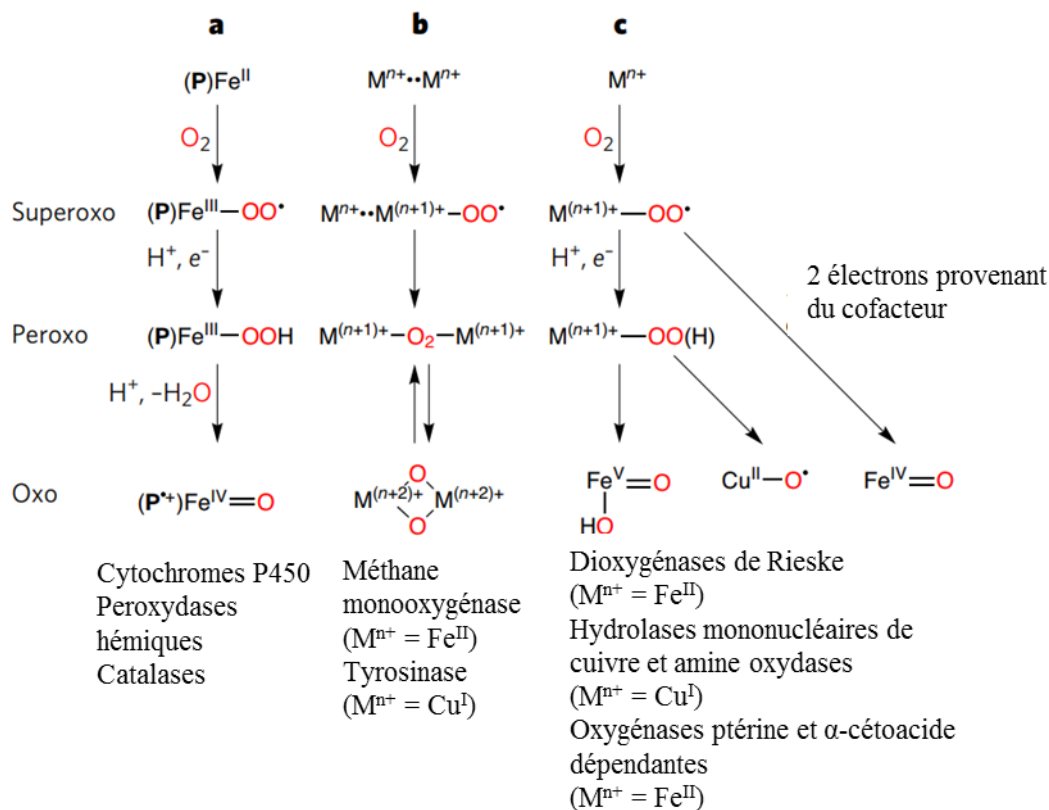


Figure I-3 : Différents mécanismes d'activation d'O₂.

1-1. Les systèmes hémiques de type cytochrome P450

Les cytochromes P450 (Cyt. P450) sont l'une des familles les plus représentatives des monooxygénases avec plus de 15 000 enzymes différentes découvertes. On les retrouve dans de nombreux organismes vivants (mammifères, plantes, insectes, champignons). Ils sont impliqués dans de nombreux rôles biologiques comme la dégradation de xénobiotiques (médicaments, toxines) ou encore la biosynthèse de petites molécules de signalisation utilisées pour le contrôle de l'homéostasie des métaux. Les Cyt. P450 sont des enzymes à fer hémique, constituées d'un atome de fer (III) coordonné à quatre atomes d'azote d'une protoporphyrine IX et à un ligand cystéinate axial qui permet l'ancrage du complexe à la protéine (**Figure I-4**).^{14, 16, 17} Les deux bras carboxylate de la protoporphyrine IX jouent un rôle important dans la stabilisation et la solubilité de l'hème.

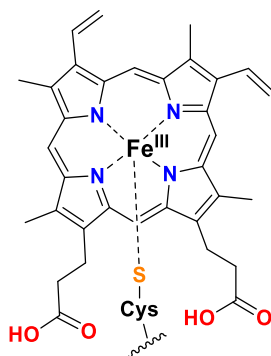


Figure I-4 : Structure de la protoporphyrine IX de fer (III) des Cyt. P450 liée à la protéine via une cystéine.

De nombreuses réactions d'oxydation peuvent être réalisées avec les Cyt. P450, comme par exemple, l'hydroxylation d'alcane, l'époxydation d'alcènes ou encore la sulfoxydation de thioéthers.¹⁶ Un exemple intéressant est apporté par le Cyt. P450 BM-3 (mutant 139-3) qui est capable de réaliser l'époxydation du styrène avec une chimiosélectivité de 100% et une activité catalytique très importante de 1100 Min⁻¹.¹⁸ Ce même système est capable de réaliser l'hydroxylation de liaisons C-H aromatiques, comme le benzène ou même des alcènes peu réactifs comme le cyclohexène ou le propylène. De manière générale, les réactions de monooxygénation réalisées par ces systèmes se traduisent selon l'équation **Figure I-5**.

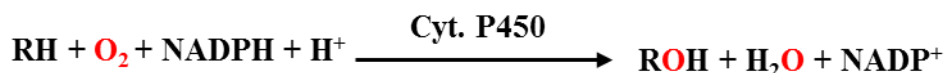


Figure I-5 : Réaction générale des monooxygénases Cyt. P450.

Grâce à de nombreuses études spectroscopiques et structurales, un cycle catalytique commun aux Cyt. P450 a été proposé et est représenté selon la **Figure I-6**.^{19, 20}

A l'état natif, l'ion ferrique est lié à une molécule d'eau (**A**). Lors de la première étape, l'approche du substrat à proximité du site actif perturbe la coordination de la molécule d'eau et force son départ (**B**). Cette perturbation entraîne un changement de l'état de spin du fer qui devient haut spin (**B**) provoquant une augmentation de son potentiel d'oxydo-réduction.²¹ La réduction de l'ion ferrique en ion ferreux, plus aisée, va être réalisée grâce l'intermédiaire d'une réductase, la NADPH Cyt. P450 réductase (CPR)^{22, 23} qui favorise le transfert d'électrons du NADPH au centre actif (**C**).

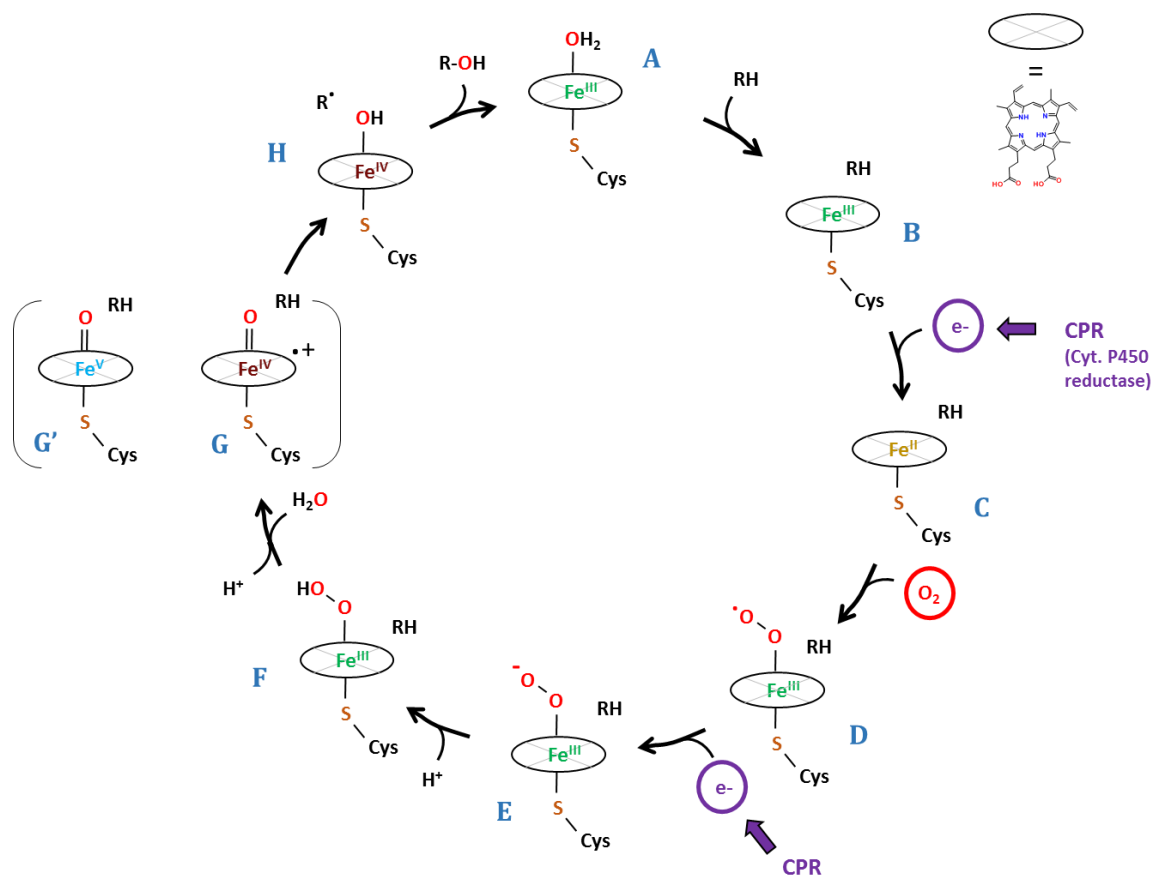


Figure I-6 : Cycle catalytique du Cyt. P450.

La molécule d'oxygène peut alors être activée pour former un intermédiaire de type Fe(III)-superoxo (**D**) qui va ensuite évoluer en intermédiaire de type Fe(III)-peroxo (**E**) en présence d'un deuxième électron délivré par la CPR. Cet intermédiaire est ensuite protonné, permettant l'obtention d'un intermédiaire de type Fe(III)-hydroperoxo (**F**) qui, en présence d'un deuxième proton, est coupé hétérolytiquement au niveau de la liaison O-O avec élimination d'une molécule d'eau et production d'une espèce oxydante hautement réactive de type Fe(IV)-oxo coordiné par un ligand radicalaire porphyrinyle (**G**).²⁴Cette espèce présente une forme tautomère de type Fe(V)-oxo (**G'**), s'il n'y a pas délocalisation de l'électron sur le ligand porphyrinyle. La forme Fe(IV)-oxo radical cation (**G**) s'avère être une espèce hautement réactive capable de réagir avec des substrats peu réactifs en réalisant une abstraction d'un atome d'hydrogène conduisant à la formation d'un radical R^\bullet et d'une espèce Fe(IV)-hydroxo (**H**). Par un mécanisme appelé « oxygen rebound »,²⁵ le radical alkyle R^\bullet va récupérer le groupement hydroxyle lié au fer afin de former l'alcool correspondant et régénérer l'état natif du Cyt. P450 (**A**).

1-2. Les enzymes à fer non hémique

1-2-1. Les enzymes dinucléaires de fer non hémique : le cas de la méthane monooxygénase

Les enzymes dinucléaires de fer participent activement à de nombreuses réactions d'oxydation dans le métabolisme des êtres vivants. Par exemple, la première enzyme de cette catégorie à être découverte fut la ribonucléotide réductase qui catalyse la réduction des ribonucléotides en désoxyribonucléotides qui sont des précurseurs de l'ADN.²⁶ De nombreux autres exemples d'oxygénases de cette catégorie pourraient être exemplifiés²⁷ mais une enzyme en particulier a attiré notre attention par sa remarquable capacité à oxyder des substrats inertes tels que le méthane en méthanol : la méthane monooxygénase (MMO).

Les bactéries méthanotrophes sont capables d'utiliser le méthane comme seule source de carbone et d'énergie. En 1966, J.W. Foster et H. Davis ont fait la découverte d'une bactérie, *Methylococcus capsulatus*,²⁸ capable d'oxyder le méthane en méthanol grâce à l'activation réductrice de l'oxygène moléculaire selon l'équation représentée en **Figure I-7**.

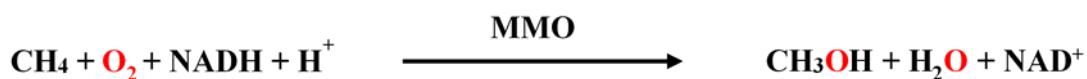


Figure I-7 : Réaction générale de la MMO.

Cette oxydation est catalysée par une enzyme, la MMO. Elle est présente sous deux formes distinctes : la méthane monooxygénase membranaire (MMOp), contenant un centre actif à base de cuivre, et la méthane monooxygénase soluble (MMOs)²⁹ présente dans le cytosol contenant un centre actif dinucléaire de fer non hémique.

La MMOs est en réalité un complexe multiprotéique comportant trois sous-unités distinctes (**Figure I-8, a**) :

- la sous-unité hydrolase (MMOH),³⁰ un hétérodimère de 251 kDa contenant le site actif dinucléaire de fer, est responsable de l'hydroxylation du méthane (**Figure I-8, b**),

- la sous-unité réductase (MMOR), monomère de 38,5 kDa contenant un centre [2Fe-2S], transfère les électrons provenant de l'oxydation du NADH à la MMOH,

- la sous-unité régulatrice (MMOB), monomère de 15,8 kDa, joue un rôle prépondérant dans la régulation du transfert d'électrons entre MMOR et MMOH.

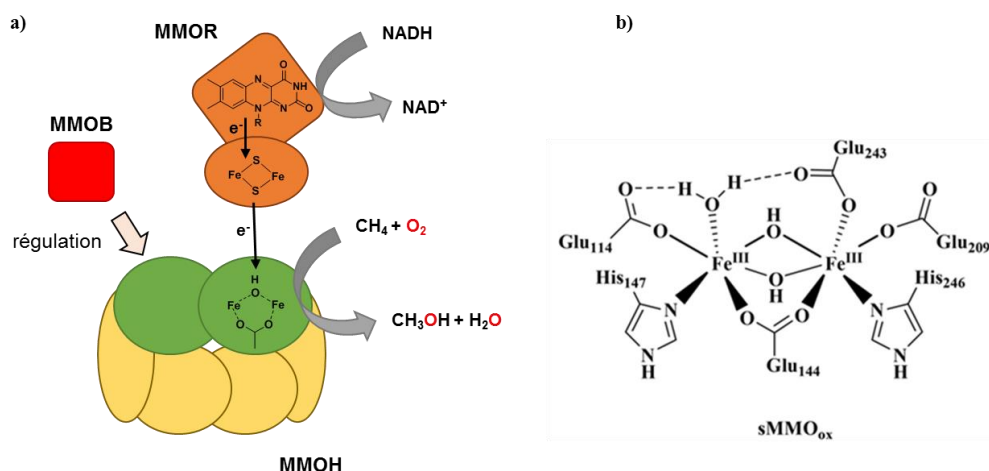


Figure I-8 : a) Organisation des différentes sous unités de la MMOs. b) Site actif dinucléaire de fer de la MMOs sous sa forme oxydée.

Suite à de nombreuses investigations basées principalement sur la modélisation d'intermédiaires réactionnels, le mécanisme le plus accepté pour la réduction de O₂ par la MMO est le suivant. Il débute par la réduction de l'espèce MMO_{ox} (2 Fe^{III}) en MMO_{red} (2 Fe^{II}).^{29, 31} Les deux électrons nécessaires à la réduction proviendraient du NADH *via* MMOR (**Figure I-8**).³² Ensuite, une molécule d'oxygène moléculaire serait activée pour former l'intermédiaire bis-Fe(III)-peroxo (**P**, **Figure I-9**)³³ qui se réarrangerait, avec la coupure de la liaison O-O et le départ d'une molécule d'eau, pour former l'intermédiaire bis-Fe(IV)-oxo (**Q**).³⁴ Le composé **Q**, très réactif, serait capable de réagir avec le méthane afin de former le méthanol par un mécanisme similaire à celui des Cyt. P450 (abstraction d'un atome d'hydrogène puis hydroxylation) puis l'état natif MMOH_{ox} serait régénéré.

Tout comme le Cyt. P450, la MMOs est capable de réaliser l'insertion d'un atome d'oxygène au sein d'une liaison C-H désactivée à partir de l'oxygène moléculaire et en présence de 2 électrons. Ces deux enzymes peuvent oxyder un grand nombre de substrats tels que des hydrocarbures. Bien qu'elles possèdent des différences au niveau de leur site actif (mononucléaire ou dinucléaire de fer), leur mécanisme d'action est assez similaire.

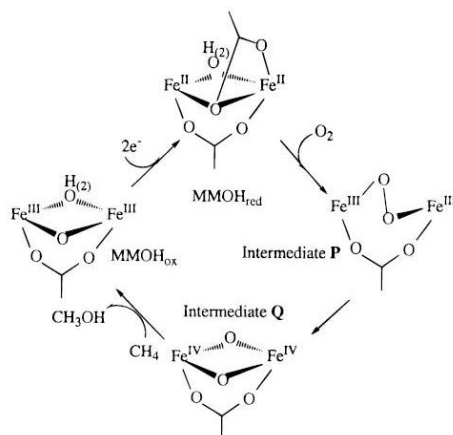


Figure I-9 : Cycle catalytique simplifié de la MMOH.

La méthane monooxygénase est aussi capable de catalyser l'époxydation d'alcènes aliphatiques de type éthène, propène ou butène avec une chimiosélectivité de 100%.³⁵

1-2-2. Les systèmes mononucléaires de fer non hémique

Les enzymes mononucléaires de fer non hémique ont un rôle primordial dans le métabolisme des acides nucléiques et des acides aminés, dans la biodégradation des composés aromatiques et dans la biosynthèse d'antibiotiques comme la céphalosporine ou la pénicilline.^{36, 37} L'environnement du métal au sein des enzymes étant plus flexible que dans le cas des systèmes hémiques, elles sont capables de réaliser une plus grande variété de réactions d'oxydation avec des substrats et des sources d'électrons plus divers que les enzymes à fer hémique ou à dinucléaires de fer non hémique.

L'émergence des études cristallographiques sur ces enzymes ont permis la découverte d'un motif structural commun, la triade faciale « 2-His-1-carboxylate ».³⁸ Elle est constituée d'un atome de fer (II) coordiné par un ligand aspartate ou glutamate, deux ligands histidines et trois molécules d'eau (sites labiles) permettant de moduler facilement la réactivité du centre métallique.³⁹

Ces enzymes forment cinq sous-familles en fonction de la réaction catalysée ou de la nature du cofacteur ou co-substrat utilisé lors de la catalyse. Les intra- et extra-diol dioxygénases constituent la première sous-famille et sont capables de réaliser la coupure oxydante de substrats type catéchol comme l'homoprotocatéchuante-2,3-dioxygénase (HPCD) ou la

dihydroxybiphényl-1,2-dioxygénase (BphC).⁴⁰ Les dioxygénases de Rieske constituent une deuxième sous-famille avec l'exemple de la naphthalène dioxygénase qui est capable de catalyser la *cis*-dihydroxylation des arènes.⁴¹ Les hydrolases ptérine-dépendantes, exemplifiées par la tyrosine hydrolase,⁴² sont des hydrolases d'acides aminés aromatiques. La quatrième sous-famille est constituée d'enzymes α -cétoglutarate dépendantes (α -KG), induites dans la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription ou encore la biosynthèse d'antibiotiques. On peut citer en exemple la déacétoxycéphalosporine C synthase (DAOCS),³⁷ la clavamate synthase (CAS)⁴³ ou la taurine/ α -KG-dioxygénase (TauD).⁴⁴ La dernière sous-famille est représentée par les oxydases biosynthétiques tels que l'isopénicilline N-synthase (IPNS),³⁸ induites dans la biosynthèse d'antibiotiques (**Figure I-10**).

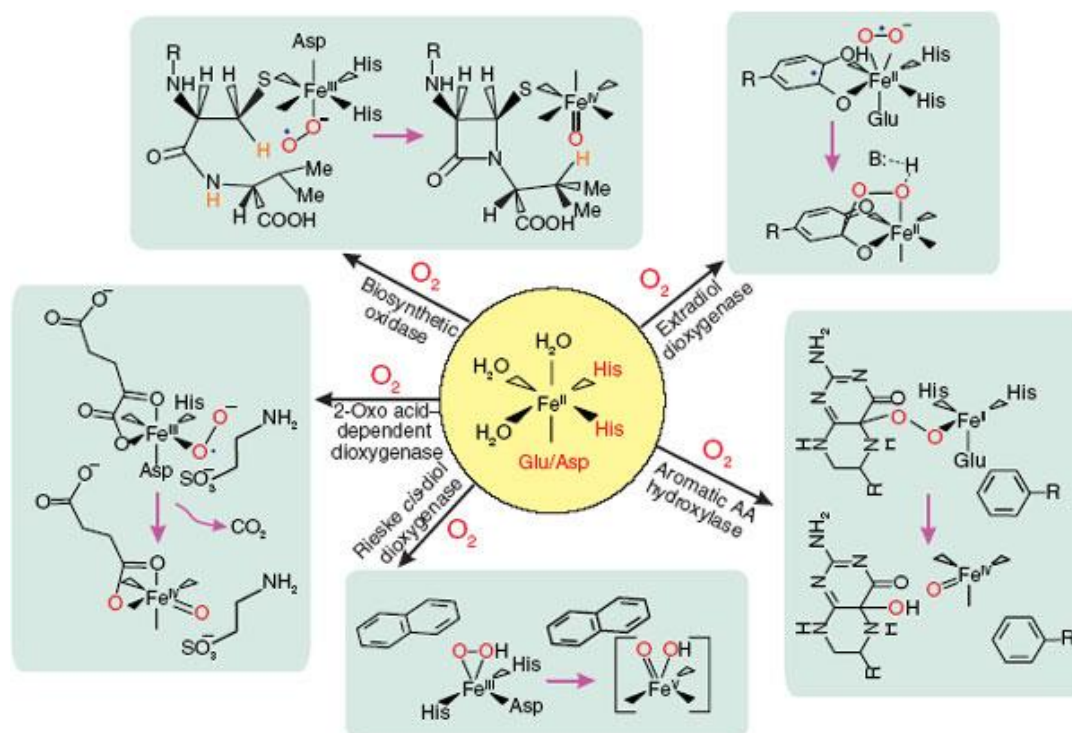


Figure I-10 : Activation du dioxygène moléculaire par des enzymes mononucléaires de fer non hémique (triade faciale 2-histidine-1-carboxylate).

Lors de cette introduction bibliographique, seulement deux sous-familles d'enzymes seront abordées : les catéchols dioxygénases et les dioxygénases de Rieske. Ces deux sous-familles ont été choisies car elles possèdent chacune une réactivité proche de celles que j'ai pu développer durant ma thèse : la coupure oxydante de liaison C=C et la dihydroxylation d'alcènes.

1-2-2-1. Les catéchol dioxygénases

Les catéchol dioxygénases, composées d'un centre actif mononucléaire de fer non hémique, catalysent la coupure oxydante de substrats de type catéchol, réaction clé dans la dégradation métabolique des composés aromatiques chez les bactéries.⁴⁵ Elles peuvent être classées en deux sous-familles : les extra-diol et les intra-diol dioxygénases (**Figure I-11**).

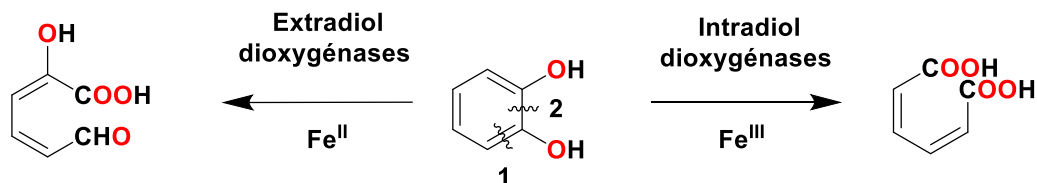


Figure I-11 : Réactions catalysées par les catéchol dioxygénases. 1=extradiol, 2=intradiol.

Des différences structurales et électroniques entre les intra- et les extra-diol dioxygénases permettent d'expliquer la différence de réactivité entre ces deux types d'enzymes. Le site actif des intra-diols dioxygénases possède un atome de Fe(III) lié par deux tyrosines, deux histidines et deux molécules d'eau alors que le site actif des extra-diol dioxygénases comporte un atome de Fe(II) lié par deux histidines, un glutamate et trois molécules d'eau. Le degré d'oxydation étant différent entre ces deux types d'enzymes, cela implique une réactivité différente (**Figure I-11**).

L'enzyme HCPD est une extra-diol dioxygénase très étudiée. De nombreuses méthodes de caractérisation, comme la cristallographie aux rayons X, ont permis de mieux comprendre le mécanisme réactionnel de cette enzyme (**Figure I-12**).⁴⁶⁻⁴⁸ La première étape du cycle catalytique est la liaison du substrat catéchol bidentate au centre métallique (2). Ensuite, O₂ est activé par l'ion ferreux conduisant à un intermédiaire de type Fe(II)-superoxo combiné à une semiquinone radicalaire (3) qui se recombine pour former un intermédiaire alkylperoxo (4).⁴⁹ Cet intermédiaire évolue ensuite en lactone *via* un réarrangement de Criegee⁴² (5) qui est hydrolysé pour donner le produit réactionnel (6). Il est important de noter qu'aucun réducteur externe n'est utilisé pour réaliser la réaction de catalyse. Les électrons proviennent directement du substrat afin de garder le centre métallique sous son degré d'oxydation +II permettant l'activation d'O₂.

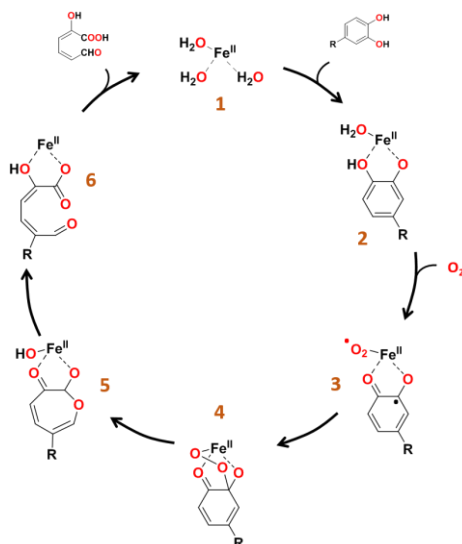


Figure I-12 : Cycle catalytique de l'extradiol dioxygénase HPCD.⁴⁶ Ne sont représentés que le fer et les ligands labiles.

1-2-2-2. Les dioxygénases de Rieske

Chez les bactéries, la première étape de dégradation de composés aromatiques est généralement réalisée par les dioxygénases de Rieske. Ces enzymes sont capables de catalyser la *cis*-dihydroxylation de doubles liaisons d'arènes et d'alcènes à partir du dioxygène.⁵⁰⁻⁵²

De nombreuses enzymes appartenant à cette famille ont été étudiées telles que la toluène dioxygénase, la benzoate dioxygénase ou encore la naphthalène dioxygénase (NDO). Cette dernière est issue de *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 et sa structure cristallographique fut déterminée en 1998.⁵³ Elle catalyse la *cis*-dihydroxylation du naphthalène selon la réaction représentée sur la **Figure I-13**.



Figure I-13 : Réaction type de la NDO.

Les oxygénases de Rieske sont incluses dans des systèmes enzymatiques constituées de trois protéines qui forment une chaîne de transfert d'électrons. La première protéine est une réductase flavoprotéine NADH-dépendante.⁵⁴ La deuxième protéine est une ferrédoxine contenant un centre [2Fe-2S].⁵⁵ Pour finir, la troisième protéine est une oxygénase contenant à la fois un centre [2Fe-2S] relié au centre mononucléaire de fer(II), par un résidu aspartate

pontant, en interaction avec les ligands histidines du centre [2Fe-2S] et du fer, dans le site actif de l'enzyme (**Figure I-14**).⁵⁶

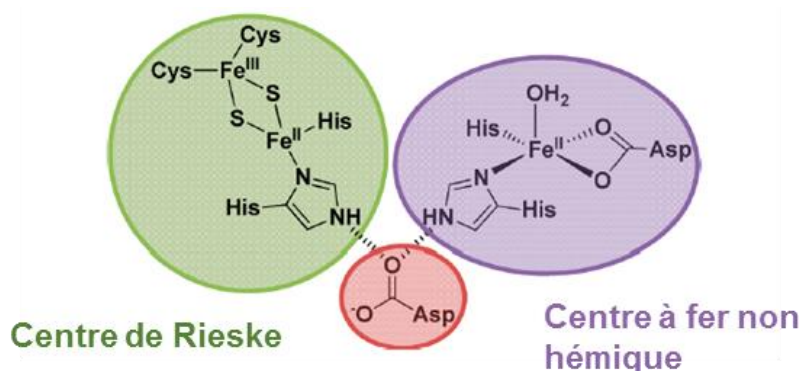


Figure I-14 : Représentation d'une oxygénase de Rieske : architecture du centre [2Fe-2S] de Rieske (en vert) et du centre actif mononucléaire de fer non hémique (en violet).

La réductase et la ferrédoxine induisent le transfert de deux électrons provenant du NADH vers l'oxygénase de Rieske, où la *cis*-dihydroxylation du naphthalène est catalysée par le centre à fer non hémique. D'importantes contributions pour l'élucidation du mécanisme réactionnel ont été apportées en 2001 par Lipscomb *et al.*⁵⁷ Dans ces expériences, en l'absence de ses partenaires physiologiques, l'oxygénase est toujours capable de catalyser la réaction si le centre de Rieske est réduit par un électron et que le centre à fer non hémique est à l'état ferreux (**Figure I-15, A**).

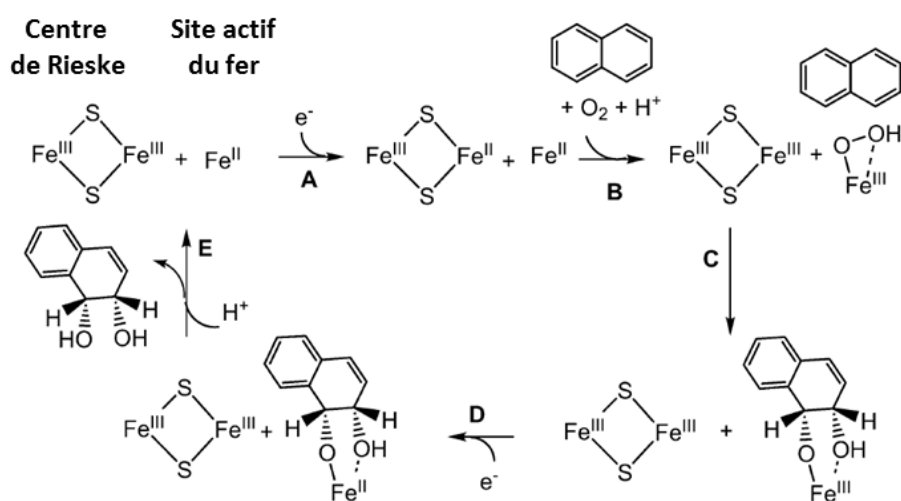


Figure I-15 : Cycle catalytique proposé pour la NDO avec un intermédiaire Fe(III)-hydroperoxo en «side-on». ⁵⁸

L'activation de l'oxygène moléculaire permettrait la formation d'un intermédiaire de type Fe(III)hydroperoxo «side-on», identifié par des études de cristallographie aux rayons X en temps résolu.⁵⁸ Sa conformation induirait un transfert stéréospécifique des deux atomes d'oxygène sur le substrat de type naphthalène (C).^{59, 60} Après formation du produit dihydroxylé, le complexe de fer serait réduit par un second électron externe (D) permettant la libération du produit réactionnel en présence d'un proton et la régénération de l'enzyme dans son état natif.

Dans ce mécanisme réactionnel, il n'est pas à exclure la formation d'une espèce de type Fe(V)-oxo-hydroxo qui surviendrait après une rupture hétérolytique de la liaison O-O de l'intermédiaire Fe(III)-hydroperoxo «side-on».⁶¹ En effet, des études de modèles biomimétiques ont démontré que les deux espèces Fe(III)-hydroperoxo et Fe(V)-oxo-hydroxo peuvent être synthétisées et sont capables de catalyser la dihydroxylation d'alcènes. Une étude récente sur des modèles basés sur N₄Py et TMC par Solomon *et al.* indique que l'état haut spin de l'intermédiaire Fe(III)-hydroperoxo est suffisamment électrophile pour réagir directement avec le naphthalène sans passer par l'intermédiaire Fe(V)-oxo-hydroxo.⁶² Néanmoins, la question reste ouverte dans le cas de l'enzyme naturelle.

La catalyse d'oxydation par la NDO peut s'étendre à d'autres substrats et sur d'autres réactivités. Par exemple, la NDO est capable de catalyser des réactions de *cis*-dihydroxylation sur divers composés aromatiques comme l'anthracène avec des rendements quantitatifs et des excès énantiomériques atteignant les 98% envers l'énantiomère *1R2S*. D'autres réactions, comme la monohydroxylation de liaison C-H ou encore la sulfoxydation de thioéthers de type thioanisole, enrichissent le panel de réactions catalysées par cette enzyme, toujours avec des rendements et des excès énantiomériques très élevés (> 80%).⁵²

1-3. Les enzymes à cuivre

Les oxygénases et oxydases à cuivre sont d'excellentes alternatives aux enzymes à fer.⁶³ Ces enzymes sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques importantes dans le métabolisme des êtres vivants comme la régulation des neurotransmetteurs, le transport de O₂ ou encore la respiration cellulaire.⁶⁴ Elles peuvent être divisées en deux catégories : les monooxygénases et les oxydases.

1-3-1. Les monooxygénases

Comme pour les monooxygénases à fer, les monooxygénases à cuivre catalysent l'insertion d'un atome d'oxygène sur un substrat exogène en activant O₂ dans un mécanisme réactionnel impliquant deux électrons. Un des exemples les plus probants de cette catégorie est la famille des polysaccharides monooxygénases (PMO). Ces enzymes sont importantes dans le milieu industriel puisqu'elles catalysent la dégradation de la cellulose ou de la lignine (**Figure I-16, a**).

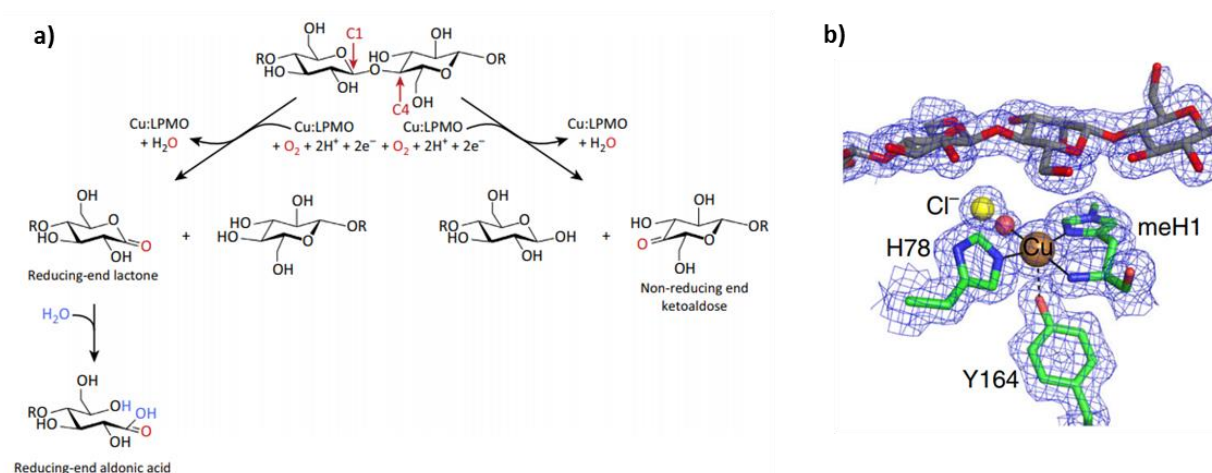


Figure I-16 : a) Réaction des PMO. b) Site actif de la PMO.⁶⁵

De nombreuses recherches ont été entreprises sur cette famille d'enzymes pour mieux comprendre les mécanismes réactionnels mis en jeu dans le cadre du développement de nouveaux catalyseurs efficaces pour la dégradation de la biomasse.⁶⁶ Depuis peu, leur site actif est connu (**Figure I-16, b**).⁶⁵ Ces enzymes peuvent être classées selon leur site de coupure du polysaccharide : les enzymes de type 1 catalysent la coupure de la liaison C-O en position C1 et les enzymes de types 2 catalysent la coupure de la liaison C-O en C4. D'après quelques investigations, le cuivre activerait O₂ à un électron afin de former une espèce active de type Cu(II)-superoxyde «end-on».⁶⁷

1-3-2. Les oxydases

Les oxydases représentent la catégorie d'enzymes à cuivre la plus importante. Contrairement aux oxygénases, les oxydases catalysent une réaction d'oxydo-réduction impliquant O₂

comme accepteur d'électrons (généralement 4 électrons).⁶³ Une des enzymes les plus décrites est la galactose oxydase (GO).^{68, 69} Cette enzyme catalyse sélectivement l'oxydation d'alcools primaires en aldéhydes couplée à la réduction à deux électrons d'O₂ en H₂O₂ (**Figure I-17, a**).

La GO est une enzyme mononucléaire de cuivre de 65-68 kDa qui possède deux ligands histidines (His694 et His581), un ligand tyrosine (Tyr495) ainsi qu'un deuxième ligand tyrosine (Tyr272) lié covalemment à une cystéine (Cys228) dans sa forme inactive comme le montre la structure cristallographique (**Figure 17, b**).¹⁵ Après la réduction à un électron de la forme inactive, l'enzyme devient active avec la formation d'un radical phénoxy qui va permettre d'oxyder le substrat.

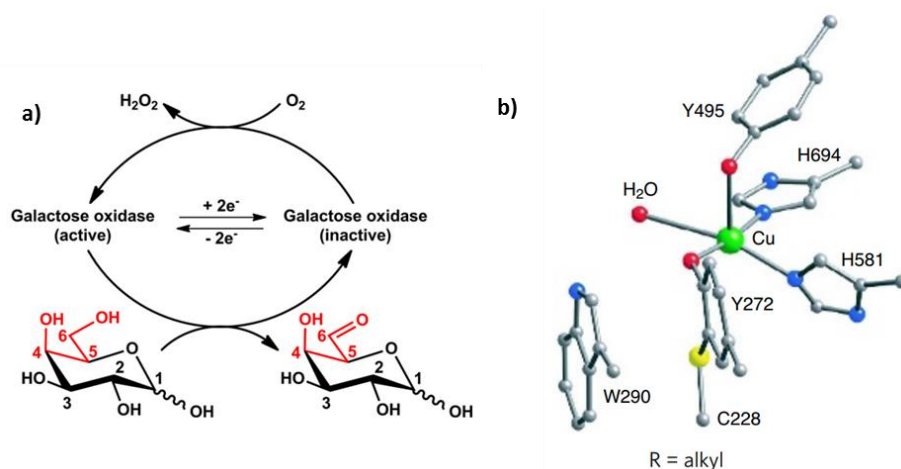


Figure I-17 : a) Réaction type de la GO. b) Site actif de la GO (forme inactive).

De nombreuses applications peuvent être attribuées à cette enzyme. Par exemple, elle est très développée dans les biocapteurs en particulier pour la détection du galactose ou du lactose. De plus, des applications dans la préparation d'hydrogels stables thermiquement ou de nouveaux aérogels sont aussi en voie de développement.^{70, 71}

1-4. Conclusion

Les oxygénases catalysent une large diversité de réactions d'oxydation l'hydroxylation d'alcane ou de composés aromatiques, la sulfoxydation de thioéthers, la coupure oxydante de catéchols, la coupure oxydante de polysaccharides, l'époxydation d'alcènes ou encore l'oxydation de composés aromatiques polycycliques ou d'hydrocarbures très difficilement

oxydables. Les oxydases peuvent oxyder des substrats organiques comme par exemple des alcools primaires en aldéhydes (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Résumé de réactivité des différentes familles d'oxygénases et d'oxydases.

	Cyt. P450	MMO	Extradiol dioxygénases	Dioxygénases de Rieske	PMO	GO
Réaction	$R-H \xrightarrow{O_2} R-OH + H_2O$	$R-H \xrightarrow{O_2} R-OH + H_2O$			$R_1-O-R_2 \xrightarrow{O_2} R_1-O + HO-R_2$	$R-OH \xrightarrow{O_2} R-C=O$
Substrat	Alcanes Aromatiques Alcènes Thioéthers	Alcanes Hydrocarbures Aromatiques Halogénures	Catéchols	Aromatiques Alcènes Thioéthers	Polysaccharides	Alcools primaires
Site actif						
Réducteur	NADPH + réductase à flavine + ferrédoxine	NADH + réductase à flavine + ferrédoxine	Substrat	NADH + réductase à flavine + ferrédoxine + Centre de Rieske	Source d'électrons	Source d'électrons
Intermédiaires actifs						

Les différents mécanismes réactionnels mis en jeu ne sont pas encore complètement élucidés que ce soit au niveau de la structure des différents intermédiaires ou de la sélectivité de la réaction. Dans ce cadre, de nouveaux complexes de fer et de cuivre bio-inspirés, modèles des différents sites actifs des enzymes présentées dans ce chapitre, ont été synthétisés. Les catalyseurs bio-inspirés ont permis de développer une meilleure compréhension des mécanismes réactionnels mis en jeu au sein des enzymes et surtout d'étendre très largement le champ de réactions et de substrats en réalisant des réactions inconnues dans la Nature.

2. Les complexes bio-inspirés

Dans le cadre du développement d'une chimie durable, la conception de nouveaux catalyseurs bio-inspirés est une nouvelle voie à explorer pour les chimistes et les biologistes.¹⁵ Pour cela, plusieurs verrous technologiques sont à débloquent : (i) la compréhension du fonctionnement des enzymes et les mécanismes réactionnels mis en jeu, (ii) la capacité à modéliser ou à mimer ces enzymes pour obtenir une réactivité semblable et (iii) la capacité à créer de nouveaux systèmes bio-inspirés capable de surpasser les performances des enzymes (réactions non naturelles, meilleure stabilité, performances catalytiques, etc...). Depuis plusieurs décennies de nombreux groupes de recherche à travers le monde ont synthétisé des complexes bio-inspirés des oxygénases à fer ou à cuivre.^{3, 72-75}

Dans ce chapitre bibliographique, nous nous intéresserons uniquement aux complexes mononucléaires de fer non hémique utilisant O₂ ou H₂O₂ comme oxydant pour réaliser l'oxydation d'alcènes. Cependant, de nombreux systèmes hémiques mimant les Cyt. P450 ont été développés lors des dernières décennies.⁷⁶ Un exemple de système catalytique à base de cuivre, réalisant l'oxydation d'alcool primaire, sera développé dans le **chapitre II**.

2-1. Les complexes de fer bio-inspirés activant O₂

L'activation de O₂ par des complexes bio-inspirés à fer non hémique a largement été étudiée, majoritairement pour la caractérisation d'intermédiaires à haut degré d'oxydation.⁷⁷⁻⁷⁹ Par exemple, F. Banse *et al.* ont décrit le premier intermédiaire Fe(IV)=O d'un complexe de fer non hémique obtenu par activation d'O₂ médié par un donneur d'électrons (BPh₄⁻) et un donneur de protons (HClO₄).⁸⁰ Dans cette étude, les auteurs ont synthétisé et caractérisé, par différentes techniques spectroscopiques, un complexe **Fe(II)-TMC-py** (TMC-py = 1-(2'-pyridylméthyl)-4,8,11-triméthyl-1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane) et son intermédiaire réactionnel à haut degré d'oxydation **Fe(IV)(O)-TMC-py**. A travers les différentes études spectroscopiques et la structure cristallographique obtenue de l'intermédiaire **Fe(IV)(O)-TMC-py**, un mécanisme réactionnel a pu être proposé (**Figure I-18**). Ce mécanisme réactionnel est proche de celui décrit pour les Cyt. P450 avec l'activation d'O₂ par le centre métallique sous sa forme réduite **Fe(II)** (**A**) pour former l'intermédiaire **Fe(III)-superoxo**. Cet intermédiaire, en présence de BPh₄⁻ et d'un proton évoluerait en **Fe(III)-hydroperoxo**. Cette dernière espèce n'a pas été observée lors de cette étude mais des complexes de Fe(III)-

hydroperoxo, à base de ligands pentadentate aminés (amine, pyridine, etc...), peuvent être obtenus et caractérisés lors de la réaction d'activation d' O_2 en présence de BPh_4^- et d'une source de proton.⁸¹ Pour la formation de l'espèce **B**, deux hypothèses sont proposées : soit une coupure homolytique de la liaison O-O, mais aucune preuve de la formation du radical OH^\bullet n'est avancée, soit une coupure hétérolytique de la liaison O-O conduisant à un intermédiaire $Fe(V)=O$ qui évoluerait rapidement en $Fe(IV)=O$.

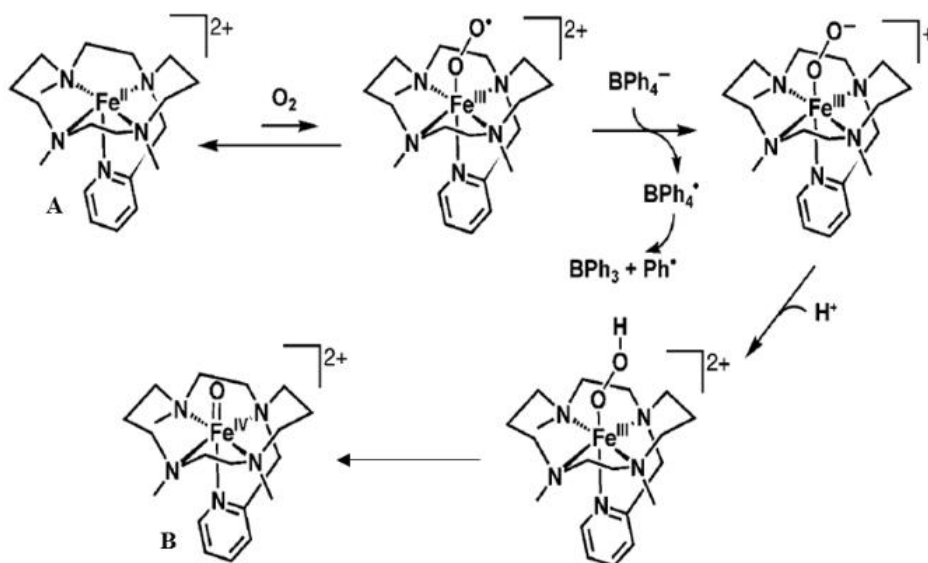


Figure I-18 : Mécanisme d'activation d' O_2 proposé par F. Banse et al.

Récemment, Gupta *et al.* ont développé un complexe mononucléaire de $Fe(III)$ possédant un ligand tétraamido macrocyclique capable d'activer O_2 , sous pression, et de générer un intermédiaire réactionnel à haut degré d'oxydation, $Fe(V)=O$, actif pour l'époxydation de dérivés du styrène (Figure I-19, a).⁸² Cette famille de complexe serait capable d'activer O_2 pour générer le dinucléaire $Fe(IV)-\mu$ -oxo permettant ainsi la formation du $Fe(V)=O$ via la coupure homolytique d'une des deux liaisons $Fe-O$. Cette étude est le premier exemple d'activation d' O_2 avec un complexe mononucléaire de fer sans l'ajout de réducteur sacrificiel. Les différentes caractérisations effectuées indiquent l'implication d'un intermédiaire à haut degré d'oxydation $Fe(V)=O$ (Figure I-19, b) bien que celui-ci n'ait pas été caractérisé. Les meilleurs résultats ont été obtenus sur le 4-méthoxystyrène, un alcène très riche en électrons, démontrant le caractère électrophile faible de l'intermédiaire oxo formé. Pour cette réactivité, l'époxyde est produit en grande majorité avec un rendement de 50% soit 80 TON. Un produit secondaire est formé, le 4-méthoxybenzaldéhyde, avec un rendement inférieur à 3%. Ce

résultat met en avant la capacité de ce système à catalyser une réaction chimiosélective. En revanche, aucune énantiosélectivité n'a été obtenue et la cinétique de la réaction est faible ($0,07 \text{ min}^{-1}$).

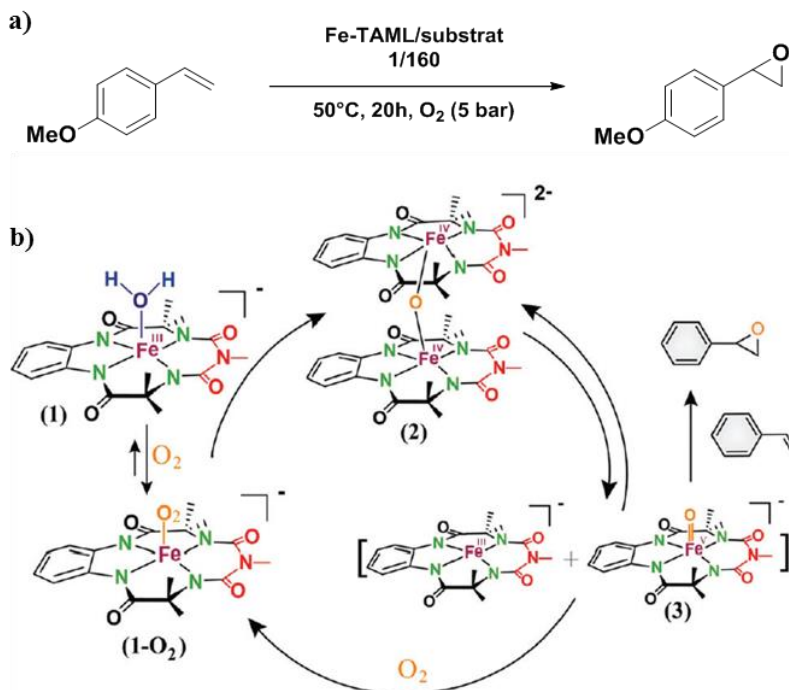


Figure I-19 : a) Conditions réactionnelles avec le complexe *Fe-TAML*. b) Mécanisme réactionnel proposé par Gupta et al.

Certaines oxygénases à fer non hémique catalysent la coupure oxydante de doubles liaisons.⁸³ En s'inspirant de ces exemples, différents catalyseurs bio-inspirés à base de fer ont été synthétisés utilisant des oxydants plus ou moins forts tels que H_2O_2 , PhIO ou encore NaIO_4 .⁸⁴⁻⁸⁶ En revanche, aucun de ces catalyseurs bio-inspirés n'est capable d'utiliser un procédé alternatif inoffensif comme l'activation d' O_2 . Dans ce cadre, Xiao *et al.* ont récemment développé une nouvelle méthode facile et plus éco-responsable pour la coupure oxydante sélective de dérivés du styrène (**Figure I-20, a**).⁸⁷ En présence du catalyseur de fer, Fe-PyBisulidine (**Figure I-20, b**), les dérivés du styrène α - et β -substitués sont oxydés jusqu'à l'obtention de composés carbonylés avec une grande efficacité, chimiosélectivité, régiosélectivité et tolérance vis-à-vis des groupes fonctionnels. Pour la très grande majorité des substrats, des rendements supérieurs à 80% sont obtenus avec une chimiosélectivité de 100%. Par exemple, pour le 4-méthylstyrène, un rendement quasi-quantitatif est obtenu (96%) soit 125 TON avec une chimiosélectivité de 100% en faveur de l'aldéhyde et une cinétique

intéressante de $0,347 \text{ min}^{-1}$. Dans le cas des α -halostyrènes, la migration du groupement halogéné a lieu permettant la formation des α -halo acétophénones correspondantes avec de bons rendements (supérieurs à 70%).

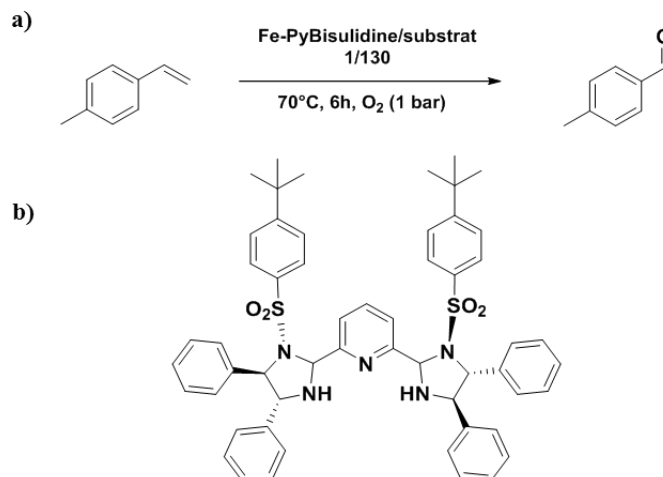


Figure I-20 : a) Conditions réactionnelles avec le complexe *Fe-PyBisulidine*. b) Ligand *PyBisulidine*.

Le mécanisme réactionnel proposé par les auteurs ferait intervenir des intermédiaires non habituels, comme par exemple, une espèce de type Fe(IV)-superoxo ou encore Fe(V) métallocycle. La formation de ce type d'intermédiaire semble donc indiquer que cette réaction de coupure oxydante serait de type radicalaire avec la formation d'un dioxirane sur le substrat styrénique qui évoluerait ensuite en aldéhyde ou cétone correspondant.

2-2. Les complexes bio-inspirés à fer activant H_2O_2

L'activation d' O_2 est un challenge très difficile en catalyse d'oxydation. En effet, le développement de catalyseurs efficaces et sélectifs pour le transfert d'un ou deux atomes d'oxygène sur un substrat exogène n'est pas aisé, notamment à cause de la haute barrière d'activation d' O_2 et de la chimie radicalaire qu'elle peut incomber qui rend difficile l'obtention d'une grande sélectivité.⁸⁸ Dans ce cadre, une solution alternative a été envisagée : l'utilisation de H_2O_2 . H_2O_2 est un oxydant plus facilement activable qu' O_2 , permettant généralement la formation d'intermédiaire peroxy conduisant au transfert d'oxygène de manière non radicalaire. Le premier exemple de bio-inspiration des dioxygénases de Rieske a été développé par L. Que Jr. *et al.* en 1999.⁸⁹ Dans cet exemple, un complexe mononucléaire

de fer non hémique qui catalyse la *cis*-dihydroxylation d'alcènes en présence d'H₂O₂ a été synthétisé. Le meilleur résultat a été obtenu sur la *cis*-dihydroxylation du cyclooctène dans les conditions catalyseur/substrat/H₂O₂ de 1/1000/40 avec un rendement modéré de 55% soit 22 TON réalisés par le catalyseur avec une chimiosélectivité de 93% et stéréosélectivité de 100%. En revanche, aucun excès énantiomérique n'a été observé.

Pour remédier à cela, L. Que Jr. *et al.* ont synthétisé de nouveaux complexes de fer possédant des ligands tétraazotés asymétriques de type N₂Py₂. La réaction asymétrique de dihydroxylation du *trans*-2-heptène en présence d'H₂O₂ a été comparée avec différents complexes de fer, le complexe **Fe-BPBP**, le complexe **Fe-6-Me₂-BPBP** et le complexe **Fe-6-Me₂-BPMCN**,⁹⁰ avec un ratio catalyseur/substrat/H₂O₂ de 1/500/10 (**Figure I-21, a et b**). Les différentes structures cristallographiques obtenues montrent que les deux complexes **Fe-BPBP** et **Fe-6-Me₂-BPBP** adoptent une topologie *cis-α* alors que le complexe **Fe-6-Me₂-BPMCN** adopte une topologie différente, *cis-β*. D'après les auteurs, la contrainte exercée par les fragments bipyrrolidine entraîne la formation de la topologie *cis-α* (**c**).

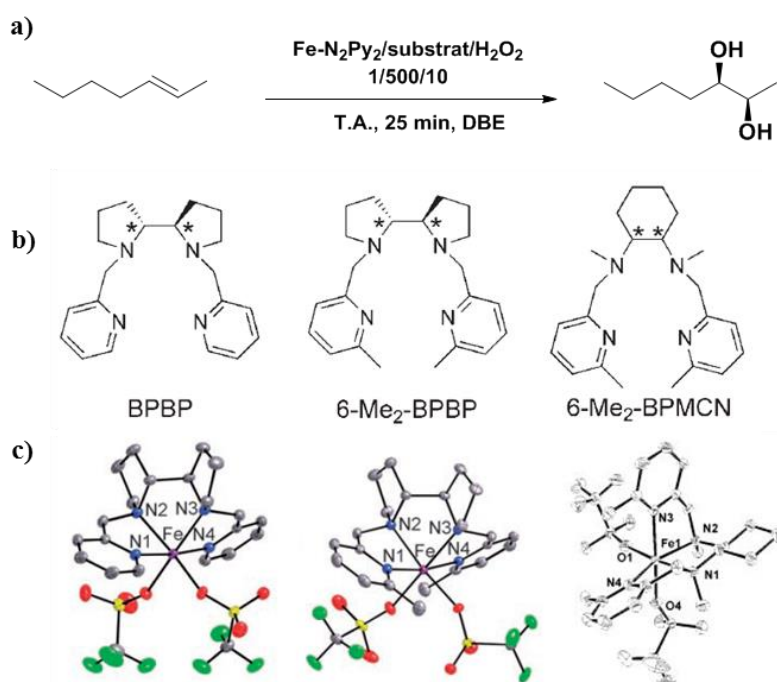


Figure I-21 : a) Conditions réactionnelles avec les complexes **Fe-N₂Py₂**. b) Ligands N₂Py₂. c) Structures cristallographiques des différents complexes de fer.

En présence du complexe **Fe-6-Me₂-BPBP**, d'excellents résultats ont été obtenus : un rendement modéré de 54%, un rapport diastéréoisomérique de 99%, un excès énantiomérique

de 97% et une chimiosélectivité de 96% en faveur du diol. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans le cas de la dihydroxylation de Sharpless en présence des ligands AD mix.⁹¹ En comparaison, le complexe **Fe-BPBP** possède des résultats beaucoup plus contrastés : l'absence de groupements méthyles entraîne une chute drastique de l'excès énantiomérique (38%) et de la chimiosélectivité en faveur du diol (21%) montrant l'importance des substituants situés en position α de la pyridine. Les résultats obtenus avec le complexe **Fe-6-Me₂-BPBP** sont meilleurs que ceux obtenus avec le complexe **Fe-6-Me₂-BPMC**N. En effet, bien que le rendement (50%) et le rapport diastéréoisomérique de 99% soient équivalents (50% et 99%, respectivement), l'excès énantiomérique est diminué à 79% et la chimiosélectivité en faveur du diol est de seulement 31%. Cette différence de réactivité proviendrait certainement de deux facteurs : (i) la plus grande rigidité du squelette bipyrrolidine comparé au squelette 1,2-diaminocyclohexane et (ii) la différence de topologie observée entre ces deux complexes (respectivement *cis*- α et *cis*- β).

Les complexes de type Fe-N₂Py₂ peuvent aussi être utilisés pour réaliser des réactions d'époxydation. Par exemple, Costas *et al.* ont décrit différents complexes qui catalysent l'époxydation énantiosélective de divers alcènes en présence d'H₂O₂ et d'acide carboxylique (**Figure I-22, a**).⁹²

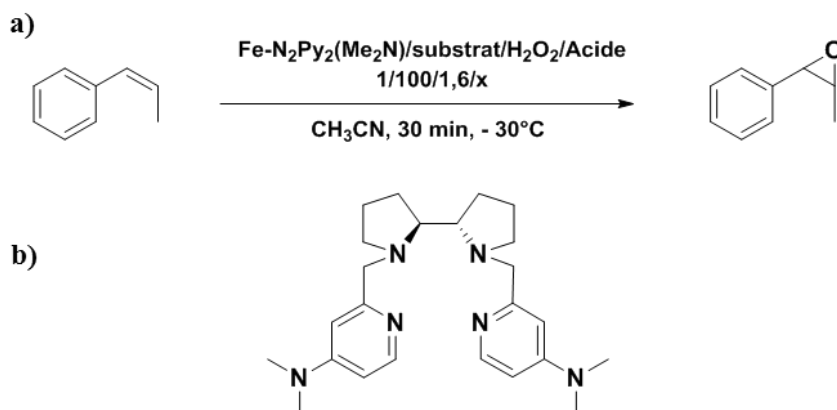


Figure I-22 : a) Conditions réactionnelles avec les complexes Fe-N₂Py₂(Me₂N). b) Ligand N₂Py₂(Me₂N).

Parmi les différents complexes testés en catalyse d'époxydation d'alcènes, le complexe de **Fe-(S,S)N₂Py₂(Me₂N)** présente les meilleurs résultats avec l'obtention de rendements quantitatifs et une énantiosélectivité avoisinant 60% (**Figure I-22, b**). Pour cette raison, seul ce complexe est discuté dans ce manuscrit. Une première expérience est réalisée sur le *cis*- β -méthylstyrene

en variant les quantités d'acide acétique afin d'observer son influence sur l'efficacité et la sélectivité de la réaction. En absence d'acide, 20% de rendement en époxyde est obtenu avec un chimiosélectivité de seulement 31% et une énantiosélectivité de 46%. En présence d'acide (3 ou 140 équivalents), le rendement, la chimiosélectivité et l'énantiosélectivité sont largement améliorés (respectivement, 87%, 87% et 62%). Ces résultats montrent que l'ajout d'un acide carboxylique joue un rôle prépondérant sur la réactivité d'époxydation. Afin d'optimiser ces résultats, différents acides carboxyliques ont été testés et comparés dans les mêmes conditions réactionnelles que précédemment. Parmi les différents acides carboxyliques testés, le *S*-Ibuprofène permet d'atteindre un rendement quantitatif en époxyde avec une chimiosélectivité de 97% et un excès énantiomérique de 86%. D'excellents excès énantiomériques, supérieurs à 98%, peuvent être obtenus en réalisant la réaction sur des substrats de type chromène.

L'implication de l'acide carboxylique dans des réactions d'oxydation, catalysées par un complexe de fer, a déjà été mise en avant dans plusieurs articles scientifiques.^{93, 94}

Le mécanisme réactionnel proposé débiterait par une première réduction par un électron d' H_2O_2 amenant la fixation de l'acide carboxylique sur le centre métallique afin de former l'espèce **Ic** (**FigureI-23**).

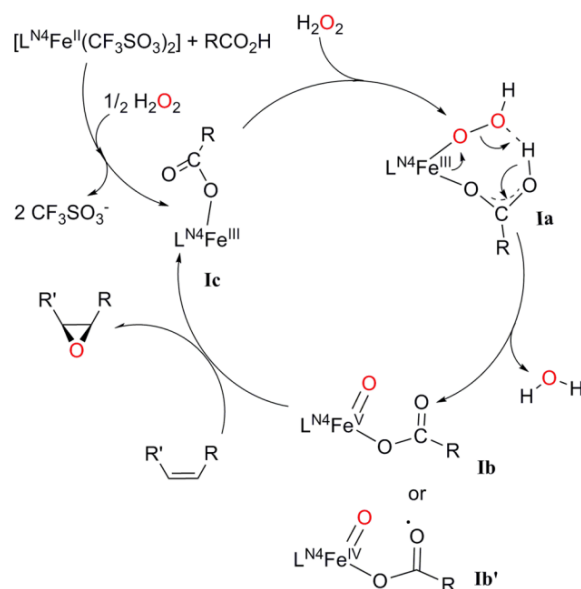


Figure I-23 : Mécanisme réactionnel proposé pour l'époxydation d'alcènes en présence d' H_2O_2 et d'acide carboxylique.

Ensuite, une molécule d' H_2O_2 serait activée par le fer (**Ia**) entraînant la coupure soit hétérolytique soit homolytique de la liaison O-O et la libération d'une molécule d'eau. La coupure de la liaison O-O conduirait à la formation d'une espèce soit de type Fe(V)=O (**Ib**) soit de type Fe(IV)=O radicalaire (**Ib'**). Cette espèce à haut degré d'oxydation serait ensuite capable de transférer son groupement oxo au sein d'une double liaison pour former l'époxyde correspondant et ainsi reformer l'espèce initiale **Ic**.

2-3. Conclusion

Actuellement, de nombreux procédés industriels utilisent des solvants organiques toxiques et des oxydants puissants, néfastes pour l'environnement. Pour cela, s'inspirer des enzymes pour créer de nouveaux catalyseurs chimiques plus respectueux de l'environnement est l'une des ambitions de nombreux chercheurs à travers le monde. De plus en plus de catalyseurs bio-inspirés sont développés dans le cadre d'oxydations efficaces, sélectives et utilisant H_2O_2 ou O_2 comme oxydant. Bien que ce domaine soit en constante progression, les performances atteintes par ce type de catalyseurs ne sont pas encore équivalentes à celles obtenues avec des enzymes. Une des stratégies employées pour développer de nouveaux catalyseurs alliant les avantages de la catalyse homogène et de la biocatalyse est la conception de métalloenzymes artificielles.

3. Les métalloenzymes artificielles

3-1. Concept général

Les enzymes possèdent des propriétés catalytiques exceptionnelles. Elles sont capables de réaliser des réactions chimiques avec une très grande sélectivité, une très grande efficacité et dans des conditions réactionnelles très douces. Par ailleurs, les catalyseurs inorganiques ont l'avantage de catalyser un très grand nombre de réactions, même inconnues dans la Nature. La combinaison de ces deux mondes constitue une ouverture prometteuse pour le développement de nouveaux catalyseurs, les métalloenzymes artificielles.

Une métalloenzyme artificielle est composée d'un complexe inorganique qui est inséré au sein d'une biomolécule (protéine, peptide ou ADN). Elle comporte deux sphères de coordination (**Figure I-24**).

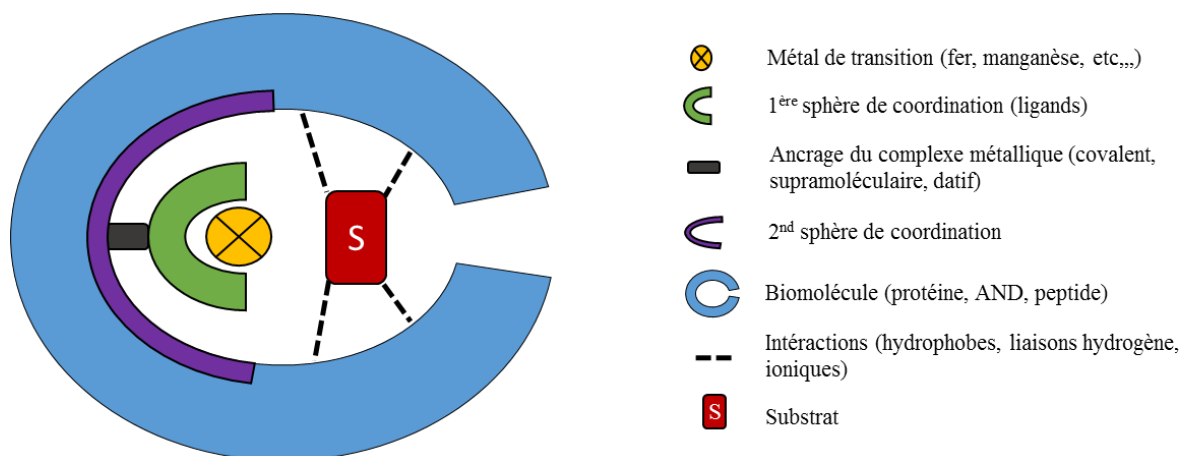


Figure I-24 : Représentation générale d'une métalloenzyme artificielle.

La 1^{ère} sphère de coordination est composée d'un ensemble de ligands qui chélatent l'ion métallique. L'ion métallique et les ligands sont choisis en fonction de la nature de la réaction visée (oxydation, hydrogénation, etc...). La 2nde sphère de coordination est généralement composée d'acides aminés ou de nucléotides qui interagissent de façon covalente ou non avec la première sphère de coordination ou directement avec l'ion métallique. Elle crée un environnement sélectif et protecteur vis-à-vis du solvant limitant la dégradation du complexe. Les métalloenzymes artificielles sont donc constituées de deux modules distincts, possédant chacun leurs propriétés, qui peuvent donc être modifiés aisément et séparément. En effet, des variations peuvent être apportées sur la 1^{ère} sphère de coordination en changeant soit l'ion métallique, soit les ligands. La 2nde sphère de coordination peut quant à elle être optimisée par

mutagenèse dirigée ou par évolution dirigée. Ces modifications permettent de créer un nouveau catalyseur hybride plus stable et plus sélectif pour la réactivité choisie.

3-2. Conception de métalloenzymes artificielles

Historiquement, la conception de métalloenzymes artificielles remonte aux années 1970 grâce aux travaux de deux groupes. En 1976, Kaiser et Yamamura ont substitué l'atome de zinc physiologique de la carboxypeptidase A (enzyme à activité d'hydrolyse de peptides) par un atome de cuivre non naturel afin de catalyser l'oxydation de l'acide ascorbique.⁹⁵ En 1978, Wilson et Whitesides ont converti l'avidine, protéine sans activité catalytique, en un nouveau biocatalyseur artificiel catalysant l'hydrogénation asymétrique de l'acide 2-acétamidoacrylique en *N*-acétylalanine en y insérant un complexe de rhodium.⁹⁶

De nombreux paramètres clés sont à prendre en compte pour l'élaboration de métalloenzymes artificielles :

- Le choix de la biomolécule (protéine, peptide ou ADN).
- Le choix du mode d'ancrage du catalyseur inorganique dans cette dernière (liaisons covalentes, liaisons datives, substitution d'un ion métallique physiologique ou liaisons supramoléculaires).
- Le choix de l'ion métallique et des ligands qui l'entourent, c'est-à-dire de la réactivité.
- La présence ou non d'un site de reconnaissance du substrat.

De plus, dans le cadre de réactions d'oxydation, le choix de l'oxydant est un paramètre supplémentaire à prendre en considération.

Dans un premier temps, le choix de la biomolécule ainsi que les différents modes d'ancrage seront illustrés. Puis, le choix de l'ion métallique et de l'oxydant seront exposés dans la partie réactivité (3-3).

3-2-1. Choix de la biomolécule

La 2nde sphère de coordination d'une métalloenzyme artificielle peut être une protéine,⁹⁷ un peptide,⁹⁸ ou un brin d'ADN.⁹⁹⁻¹⁰¹ Le choix de la biomolécule dépend du type de réactions que l'on souhaite catalyser avec cet hybride. Il est nécessaire que la réaction soit bio-orthogonale pour qu'elle puisse être réalisée en présence de la biomolécule choisie. Par exemple, il serait plus judicieux, pour une réaction de catalyse d'oxydation, d'utiliser une

protéine plutôt qu'un brin d'ADN, plus sensible aux coupures oxydantes au niveau des sucres.¹⁰² Une très grande partie de cette thèse étant consacrée aux réactions d'oxydation, nous nous sommes focalisés sur la conception de métalloenzymes artificielles à base de protéines.

De nombreux critères sont à prendre en compte lors de la conception d'une nouvelle métalloenzyme artificielle : (i) la quantité de protéine disponible, (ii) la stabilité et (iii) la connaissance des propriétés structurales. En effet, il est nécessaire d'avoir une quantité suffisante de protéine pour mener à bien les nombreux tests catalytiques. Cette protéine peut être soit commerciale, soit produite aisément avec une purification facile. La stabilité d'une protéine est un point crucial à prendre en compte en particulier lors de réactions d'oxydation. Généralement, les oxydants utilisés dans les catalyses sont assez puissants pour oxyder la protéine. Il est donc nécessaire qu'elle soit robuste pour éviter une dégradation rapide. La connaissance des données structurales de la protéine est un avantage considérable lors de la conception d'un nouvel hybride. En effet, la résolution de la structure de la protéine par diffraction des rayons X permet d'apporter de nombreuses informations comme la nature de la 2nde sphère de coordination ou encore déterminer par quelle stratégie d'ancrage le complexe métallique va être inséré au sein de la protéine.

3-2-2. Stratégies d'ancrage

Le catalyseur inorganique peut être ancré au sein de la biomolécule *via* différentes stratégies. Ces stratégies peuvent être classées en quatre catégories (**Figure I-25**) :

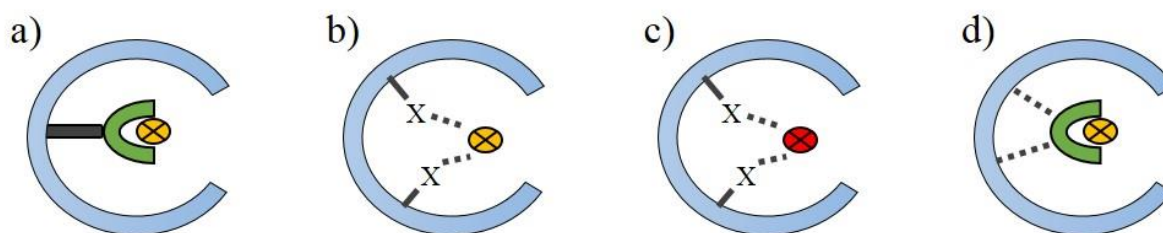


Figure I-25 : Stratégies d'ancrage pour l'élaboration de métalloenzymes artificielles :
a) liaison covalente, **b)** liaison dative, **c)** substitution d'un ion métallique et **d)** interactions supramoléculaires.

- par liaison(s) covalente(s), entre le(s) ligand(s) du complexe et un acide aminé de la protéine (**a**).

- par liaison dative, entre l'ion métallique et un acide aminé de la protéine (**b**).
- par substitution de l'ion métallique, en échangeant le métal naturel par un autre métal (**c**).
- par interaction(s) supramoléculaire(s) entre le(s) ligand(s) du complexe et la biomolécule (**d**).

3-2-2-1. Ancrage covalent

L'introduction d'un complexe inorganique au sein d'une protéine peut être effectuée *via* la formation d'une ou plusieurs liaisons covalentes entre le(s) ligand(s) du complexe et la protéine. Cet ancrage se fait par l'intermédiaire d'une réaction chimique entre un nucléophile et un électrophile au sein de la protéine de façon bio-orthogonale. Concernant les acides aminés, ils peuvent être répertoriés selon deux catégories distinctes : les acides aminés naturels, comme par exemple la cystéine¹⁰³ ou la sérine,¹⁰⁴ et les acides aminés non naturels, possédant un groupement azoture par exemple.¹⁰⁵

La stratégie la plus couramment utilisée pour réaliser l'ancrage covalent d'un complexe inorganique au sein d'une protéine est l'alkylation d'une cystéine. L'avantage de l'utilisation des cystéines est le nombre important de partenaires électrophiles disponibles pour réaliser la réaction. Par exemple, les dérivés d'halogénures d'alkyles ou les composés de type carbonyle α -halogénés sont des partenaires électrophiles très utilisés.¹⁰³ En 1997, le groupe de Marc Distefano a développé une métalloenzyme artificielle avec cette stratégie.¹⁰⁶ En effet, ils ont intégré un groupement iodoacétamide couplé à une phénanthroline (ligand) au sein d'une protéine de transport de lipides (ALBP) grâce à une réaction avec la Cys117 (**Figure I-26**). En présence de cuivre, la métalloenzyme artificielle ALBP-Phen-Cu(II) est capable de catalyser l'hydrolyse énantiosélective de liaisons ester ou amide avec des excès énantiomériques (*ee*) pouvant atteindre 86%.

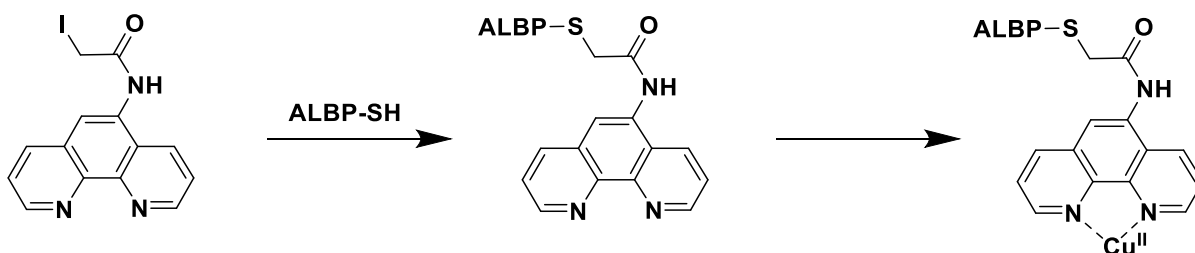


Figure I-26 : Ancrage covalent du complexe métallique Cu^{II}-Phen dans la protéine ALBP.¹⁰⁶

Dans une approche légèrement différente, Lu *et al.* ont proposé d'ancrer un complexe de Mn(salen) au sein de la myoglobine (Mb) sous sa forme apo (**Figure I-27**).¹⁰⁷ Contrairement à l'ALBP, la Mb ne possède pas de cystéines dans sa structure originelle. Ils ont donc décidé de muter une lysine (Lys72) et une tyrosine (Tyr103) en deux résidus cystéine par la méthode de mutagenèse dirigée. Ces deux cystéines peuvent ensuite réagir avec les deux ligands méthane thiosulfonate du complexe pour réaliser l'ancrage covalent. La réaction de sulfoxydation du thioanisole a été étudiée en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme oxydant.

La métalloenzyme artificielle possédant un complexe doublement ancré s'est révélée beaucoup plus active que celle dont le complexe est ancré au sein de la Mb par une seule liaison covalente (390.10⁻³ contre 51.10⁻³ min⁻¹). De plus, l'excès énantiomérique obtenu est bien plus intéressant (51% vs 12%). Ce phénomène pourrait s'expliquer par la rigidification accrue du complexe lors du double ancrage amenant à une amélioration de l'activité catalytique et de la sélectivité.

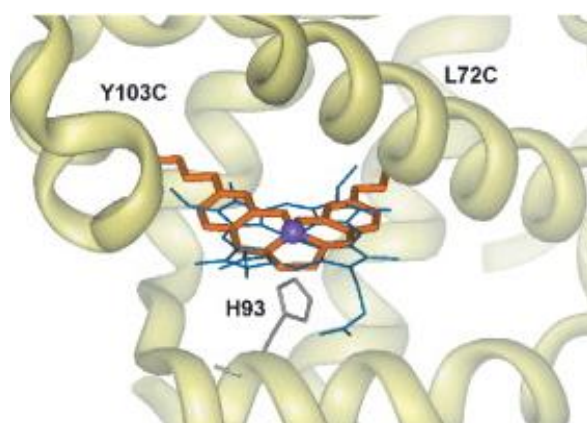


Figure I-27 : Représentation obtenue en modélisation moléculaire de la métalloenzyme artificielle Mb/Mn-salen.¹⁰⁷ Le métal est représenté en mauve, le ligand salen en orange et l'hème natif en bleu.

Un des inconvénients de l'utilisation de la stratégie d'alkylation de cystéines est la fixation aspécifique du complexe au sein de la protéine. En effet, si la protéine possède d'autres cystéines au sein de sa structure, le complexe pourrait s'y fixer ce qui pourrait entraîner une perte de réactivité et/ou de sélectivité.¹⁰⁸ Pour pallier ce problème, Lewis *et al.* ont développé une métalloenzyme artificielle possédant un acide aminé *p*-azidophénylalanine unique permettant l'ancrage à un endroit spécifique de la protéine tHisF en utilisant la méthode SPAAC (cyclo-additions azide-alcyne activées par contrainte).¹⁰⁵ Cette métalloenzyme

artificielle est alors capable de catalyser des réactions de cyclopropanation ou d'insertion de groupements silanes.

3-2-2-2. Insertion dative

L'ancrage par liaisons datives repose sur la coordination directe de l'ion métallique à un ou plusieurs acides aminés de la protéine (histidine, acide glutamique, cystéine, acide aspartique, etc...). Watanabe *et al.* ont développé une métalloenzyme artificielle en insérant un complexe de chrome de type salophène dans la protéine apo-Mb, à la place de l'hème natif, par liaison dative entre l'atome de chrome et l'His93 de la protéine (**Figure I-28**).¹⁰⁹

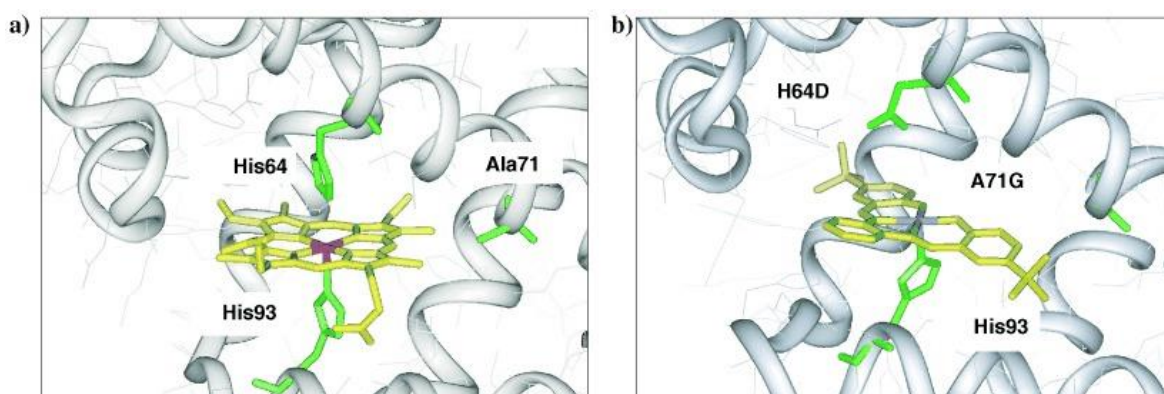


Figure I-28 : Comparaison entre **a)** la structure cristalline de la Mb native et **b)** une proposition de structure pour la métalloenzyme artificielle Cr-salophen (H64D et A71G).¹⁰⁹

La reconstitution de l'apo-Mb avec un hème a été très étudiée par cristallographie des protéines (**a**). Watanabe *et al.* ont prédit que la double mutation de cette protéine sur l'alanine 71 et l'histidine 64 permettrait l'ancrage du complexe de chrome par liaison dative avec l'histidine 93 (**b**). La modification de ces acides aminés a été déterminée par l'intermédiaire de calculs avec le programme Insight II (Accelrys). Cette métalloenzyme est capable de catalyser la sulfoxydation du thioanisole en présence de peroxyde d'hydrogène avec un rendement de 83% et un *ee* de 8% en faveur de l'énantiomère *S*.

3-2-2-3. Substitution d'un ion métallique

La diversité de réactions des métalloenzymes naturelles dépend des métaux disponibles dans leur environnement (fer, cuivre, etc...) ce qui restreint le champ des possibilités notamment

dans le cas des réactions abiotiques. Bien que de nombreux progrès aient été effectués en ingénierie des protéines, la réactivité des enzymes natives est encore limitée à la réactivité inhérente au métal. Une approche intéressante est donc le remplacement du métal natif par d'autres métaux (iridium, rhodium, platine, etc...) pour leur conférer des réactivités nouvelles (**Figure I-29**).

Généralement, la première étape est d'obtenir l'enzyme sous sa forme apo. Pour cela, soit l'ion métallique est extrait par ajout d'agents chélateurs, comme l'EDTA, soit la protéine est directement exprimée et purifiée sous sa forme apo.¹¹⁰ Ensuite, le métal de choix peut être introduit au sein de la protéine pour former la métalloenzyme artificielle.

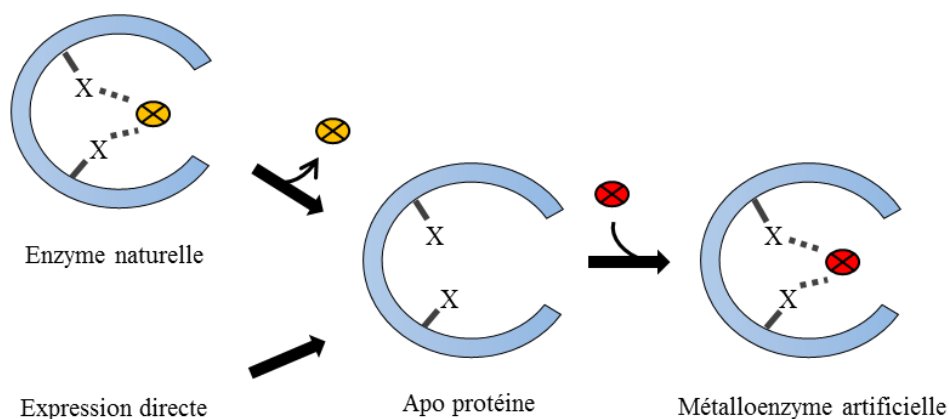


Figure I-29 : Stratégie de substitution par extraction d'un ion métallique.

De cette façon, Hartwig *et al.* ont remplacé l'atome de fer dans la protéine PIX par d'autres métaux pour élaborer des métalloenzymes artificielles qui catalysent l'insertion de carbènes dans une liaison C-H ou la cyclopropanation d'alcènes.¹¹¹ Dans cette étude, différents métaux (Co, Cu, Mn, Rh, Ir, Ru, Ag) possédant, généralement, un ligand axial (chlore, méthyle ou carbonyle) ont été insérés au sein de l'apoprotéine PIX afin de former huit nouvelles métalloenzymes (**Figure I-30**).

La métalloenzyme artificielle Ir(Me)-PIX possède l'activité catalytique la plus grande comparée aux autres hybrides testés que ce soit sur la réactivité d'insertion de carbène dans une liaison C-H ou lors de la cyclopropanation d'alcène. Les activités catalytiques sont généralement deux fois plus élevées que les autres hybrides (60 TON pour l'insertion de carbène et 20 TON pour la cyclopropanation).

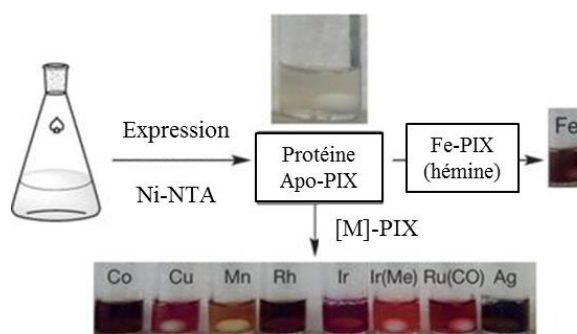


Figure I-30 : Production de la protéine apo-PIX puis métallations diverses de cette protéine pour générer les différentes métalloenzymes artificielles.

En comparaison, l'hybride de référence à base de fer ne possède aucune activité catalytique que ce soit pour l'insertion de carbène ou la cyclopropanation. Cette étude montre l'intérêt d'insérer des métaux nobles au sein des métalloenzymes artificielles afin de réaliser des réactions non naturelles de manière efficace et sélective. En revanche, dans le cadre d'une chimie durable, l'insertion de métaux nobles n'est pas la stratégie privilégiée. Un véritable challenge réside donc dans la conception de métalloenzymes artificielles à base de métaux physiologiques capables de réaliser des réactions non naturelles tout aussi efficaces et sélectives.

3-2-2-4. Interaction supramoléculaire

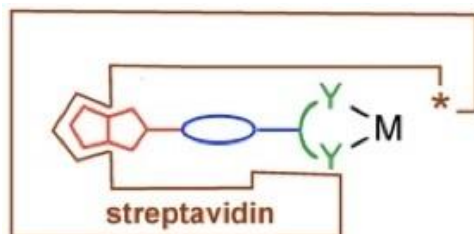
L'ancrage par liaisons supramoléculaires repose sur l'insertion d'un complexe métallique *via* différentes interactions non covalentes : les interactions hydrophobes, les interactions électrostatiques, les interactions de type π -stacking ou les liaisons hydrogène. L'ancrage *via* des liaisons supramoléculaires peut être divisé selon deux catégories :

- la stratégie du Cheval de Troie : le complexe est lié covalamment à un substrat spécifique de l'enzyme (exemple : la biotine est un substrat naturel de l'avidine) (i).
- La stratégie hôte/invité : le complexe inorganique possède des ligands capables de réaliser des liaisons supramoléculaires avec des acides aminés de la protéine (ii).

i- La stratégie du Cheval de Troie

Les précurseurs dans ce domaine, Wilson et Whitesides, ont publié la première métalloenzyme artificielle utilisant la stratégie du Cheval de Troie pour catalyser une réaction

d'hydrogénation énantiosélective.⁹⁶ Dans cet exemple, un complexe de rhodium (I), lié à une molécule de biotine, est ancré au sein de la (strept)avidine. Ce choix est basé sur l'interaction forte entre la protéine et son substrat spécifique, la biotine ($\sim 10^{-15}$ M) (**FigureI-31**).



FigureI-31 : Vue idéalisée de la stratégie du Cheval de Troie avec la reconnaissance biotine-(strept)avidine. En rouge la biotine, en bleu le bras espaceur, en vert les ligands du métal, en noir l'ion métallique et en marron la streptavidine.

Depuis, de nombreux groupes ont exploité cette méthodologie pour créer de nombreuses métalloenzymes artificielles, notamment le groupe de T. Ward.¹¹² Afin d'élargir le champ de réactions abiotiques possibles avec les enzymes, de nombreux ions métalliques (Pd, Rh, V, Os, Rh, etc...) ont été introduits dans la (strept)avidine. Par exemple, en 2003, l'hydrogénation énantiosélective de l'acide acétamidoacrylique a été réalisée par un complexe de rhodium (I) possédant un ligand amino-diphosphine biotinylé ancré dans la streptavidine avec un excès énantiomérique de 92% en faveur de l'énantiomère *R*.¹¹³

ii- La stratégie hôtes/invités

Cette stratégie repose sur des interactions supramoléculaires directement entre les acides aminés de la protéine et les ligands du complexe métallique. Pour illustrer cette stratégie d'ancrage, en 2010, Cavazza *et al.* ont conçu une nouvelle métalloenzyme artificielle à partir de la protéine NikA.¹¹⁴ Dans cette étude, ils ont ancré un complexe de fer non hémique au sein de cette protéine par l'intermédiaire d'un réseau de liaisons supramoléculaires ($K_d \sim 5$ M). L'interaction principalement responsable de cet ancrage est la formation d'un pont salin entre l'arginine137 de la protéine et le ligand carboxylate du complexe métallique. Ce groupement carboxylate est également stabilisé par l'interaction avec une molécule d'eau liée à la tyrosine 402. Finalement, ce complexe est stabilisé par un réseau de liaisons faibles de type CH- π avec les tryptophanes100 et 398. Dans cette étude, ils ont observé par

crystallographie des protéines les différentes étapes de l'activation d'O₂ par le complexe (Figure I-32).¹¹⁴

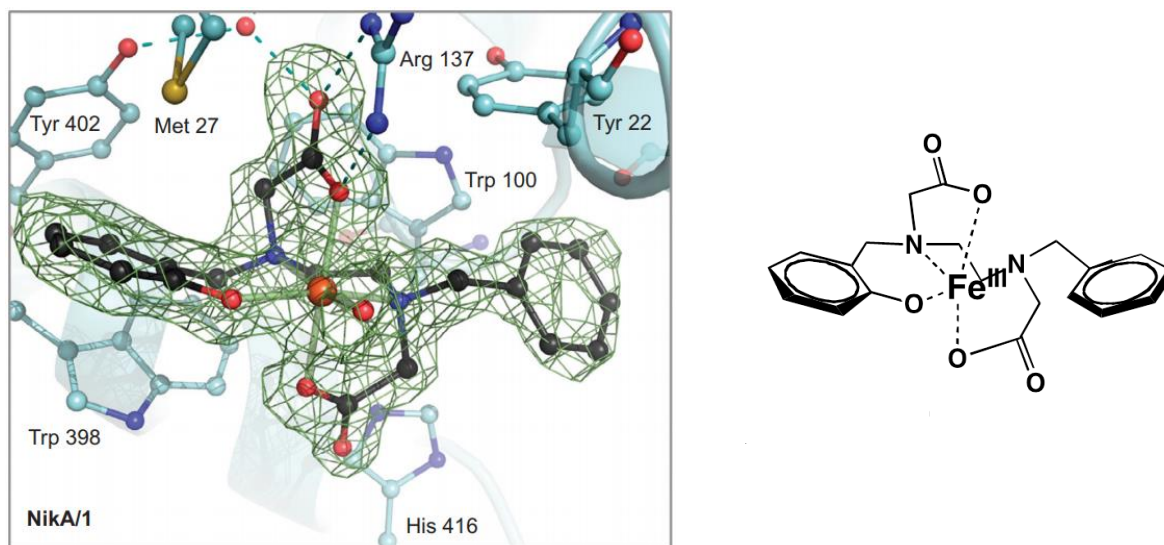


Figure I-32 : A gauche, la structure cristallographique de l'hybride **NikA/Fe-L0**. A droite, la vue schématique du complexe de **Fe-L0**.

3-3. Réactions d'oxydation avec les métalloenzymes artificielles

3-3-1. Sulfoxydation

Les sulfoxydes énantiopurs sont des synthons chiraux très importants pour la synthèse organique et ont trouvé de nombreuses applications comme auxiliaires chiraux ou ligands en catalyse énantiosélective.¹¹⁵ Ce motif est également très recherché dans le domaine pharmaceutique avec de nombreux principes actifs déjà développés comme l'oméprazole (inhibiteur de la pompe à protons) (Figure I-1). L'oxydation énantiosélective de thioéthers a donc gagné une considérable attention comme la mise au point d'une synthèse aisée de ces composés d'intérêt.¹¹⁶

Dans ce cadre, de nombreuses « sulfoxydases artificielles » ont donc été développées ces dernières années. Le premier exemple de sulfoxydases artificielles a été reporté par Sheldon *et al.* en 1998.¹¹⁷ Lors de cette étude, ils ont inséré un sel de vanadium (Na₃VO₄) au sein de la phytase afin de lui conférer une nouvelle réactivité de sulfoxydation (enzyme catalysant l'hydrolyse d'esters de phosphate en absence de métal). Cet hybride phytase/VO₄ catalyse la sulfoxydation énantiosélective du thioanisole (substrat de référence) en présence d'H₂O₂ avec

un excellent rendement (100%) et de bons d'excès énantiomérique (66% en faveur de l'énantiomère *S*). Or, la protéine seule est aussi capable de réaliser la sulfoxydation énantiosélective avec 47% de rendement et 47% d'*ee*. Quelques investigations ont été réalisées pour comprendre cette réactivité en absence de métal. L'hypothèse la plus probante serait la formation d'un acide carboxylique formé à partir de l'aspartate 339, situé au cœur du site actif, et de H₂O₂.

Dans la suite de ce chapitre bibliographique, les exemples les plus marquants de « sulfoxydases artificielles » ont été répertoriés en fonction de la protéine utilisée. Ils ont été classés en cinq catégories : les « sulfoxydases artificielles » à base de myoglobine, de streptavidine, de BSA, de NikA et d'anticorps.

3-3-1-1. Sulfoxydases à base de myoglobine : comparaison des hybrides à base de chrome ou de manganèse

Les premiers hybrides à base de myoglobine ont été développés en 2003 par Watanabe *et al.* ont été testés sur la réaction de sulfoxydation du thioanisole par H₂O₂ (**Figure I-33, a**). Différentes combinaisons d'ions métalliques (Mn ou Cr) et de ligands ont été comparés sur cette réactivité (**Figure I-33, a**). L'hybride **Mb(H64D/A71G)/Cr-LA** s'est montré peu réactif avec des excès énantiomériques faibles (0,078 min⁻¹ et 13% *ee*) (**Figure I-33, a**).¹⁰⁹

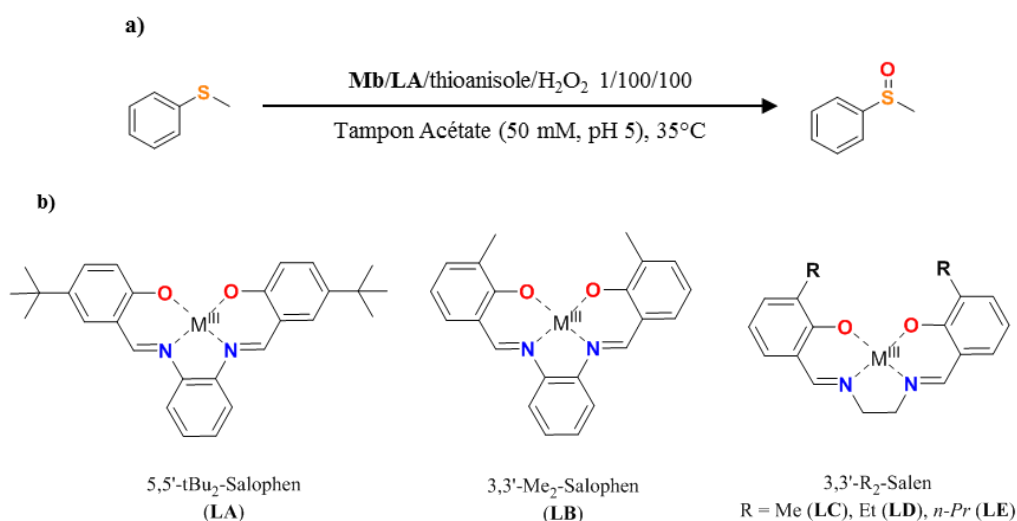


Figure I-33 : a) Conditions de sulfoxydation du thioanisole (*M* = Mn ou Cr). b) Complexes employés (*M* = Mn ou Cr).

En revanche, il est important de noter que l'activité catalytique du complexe **Cr-LA** seul est drastiquement diminuée d'un facteur 6 et aucune énantiosélectivité n'est observée par rapport à l'hybride montrant l'importance de l'incorporation de ce complexe au sein de la Mb.

Suite à cette étude, quatre nouveaux ligands ont été synthétisés pour améliorer l'énantiosélectivité de la réaction en ajustant la position du complexe au sein du site actif. **(b)**. Basée sur des données structurales obtenues, l'insertion de groupements alkyles en position 3 et 3' (LB → LE) au lieu de 5 et 5' (LA) sur les groupements phénoliques a permis de mettre en évidence une meilleure stabilisation des différents complexes correspondants (Cr ou Mn) au sein de la protéine *via* des interactions hydrophobes (**Figure I-34**).

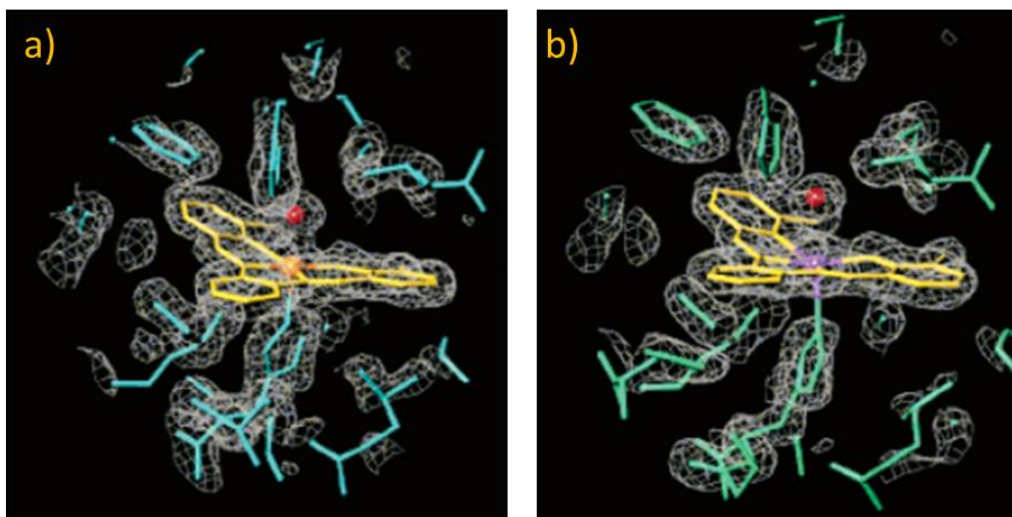


Figure I-34 : a) Structure cristallographique de l'hybride **Mb/Cr-LB** et b) Structure cristallographique de l'hybride **Mb/Mn-LB**.

Pour les hybrides à base de chrome, la mutation de l'histidine 64 en aspartate (H64D) a une influence positive non négligeable sur la réactivité : l'activité et les excès énantiomériques sont multipliés par 6 ($0,13 \text{ min}^{-1}$ et 30% d'*ee*). En comparaison, l'hybride **Mb(H64D/A71G)/Mn-LA** a une réactivité similaire à son homologue chromé avec une activité de $0,158 \text{ min}^{-1}$ et des excès énantiomériques atteignant les 23%. De plus, pour les deux hybrides, le changement de ligand (**LB** par **LC**) permet de doubler l'activité catalytique allant jusqu'à $0,21 \text{ min}^{-1}$ (Cr) et $0,46 \text{ min}^{-1}$ (Mn). L'excès énantiomérique a lui aussi été amélioré avec, respectivement, 33% et 32%.

Par la suite, des études mécanistiques ont été entreprises afin de déterminer l'influence de la 2nde sphère de coordination sur la formation du sulfoxyde. Ces études ont été réalisées uniquement sur les hybrides à base de complexes de manganèse où l'activité et la sélectivité des ligands **LC** (Me), **LD**(Et) et **LE** (*n*-Pr) a été comparée. Le remplacement des groupements méthyles par des groupements éthyles ou *n*-propyles changerait la position de l'ion métallique au sein du site actif. Cette hypothèse est validée par des études de modélisation moléculaire qui indiquent que la position du manganèse au sein du site actif est différente en fonction du ligand (**Figure I-35**). En revanche, la position du thioanisole, stabilisé par des liaisons hydrophobes entre la phénylalanine 43 et la leucine 32, reste inchangée quel que soit le ligand utilisé. Ces considérations indiquent que les positions relatives de l'atome de soufre et de l'ion métallique pourraient être variables (**Figure I-35**) résultant du changement d'énantiosélectivité observée avec ces différents ligands (32% *S*, 5% *S* et 13% *R*, respectivement).

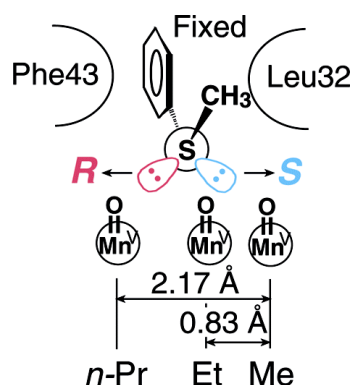


Figure I-35 : Régulation du mécanisme de sulfoxydation en fonction des ligands **LX**.

Pour conclure, l'activité catalytique a été améliorée en modifiant les ligands bases de Schiff avec une activité maximale de 2,7 min⁻¹ avec l'hybride **Mb(A71G)-LE**. De plus, l'énantiosélectivité peut être régulée en jouant sur la position de l'ion métallique au sein de la cavité. Cet exemple illustre parfaitement l'avantage de concevoir des métalloenzymes artificielles. Cela permet : (i) de conférer une activité catalytique à une protéine qui n'en possède pas à l'état natif, (ii) de moduler aisément le site actif que ce soit au niveau de la 1^{ère} ou de la 2nde sphère de coordination du métal afin d'améliorer l'activité et la sélectivité de la réaction et (iii) d'apporter de nombreuses informations structurales sur l'enzyme créée notamment grâce à la cristallographie des protéines.

3-3-1-2. Sulfoxydase à base de streptavidine

Ward *et al.* ont mis au point une nouvelle sulfoxydase artificielle avec l'insertion d'un sel de vanadium au sein de la cavité de la streptavidine. Cet hybride catalyse l'oxydation énantiosélective de thioéthers prochiraux avec de l'hydroperoxyde de *tert*-butyle (**Figure I-36**).¹¹⁸ Il a été démontré que l'ion vanadyle était incorporé au sein de la poche de fixation de la biotine en interagissant directement avec les acides aminés de la protéine.

Des études catalytiques sur le thioanisole ont mis en évidence que l'ancrage de l'ion vanadyle au sein de la streptavidine permettait l'activation de ce dernier pour la catalyse. En effet, les activités catalytiques de la protéine seule ou de l'ion métallique seul sont très faibles (0,015 et 0,011 min⁻¹, respectivement) alors que celle de l'hybride est d'environ 13 à 17 fois plus élevée (0,2 min⁻¹). De plus, cette étude permet la mise en lumière de l'importance de la 2nde sphère de coordination dans la formation de sulfoxydes chiraux. En effet, seul l'hybride conduit à des excès énantiomériques (46% *ee*). D'excellents *ee* ont été obtenus dans le cas des deux substrats les plus encombrés : l'éthylphénylthioéther et le méthylnaphtylthioéther (90% et 93%, respectivement).

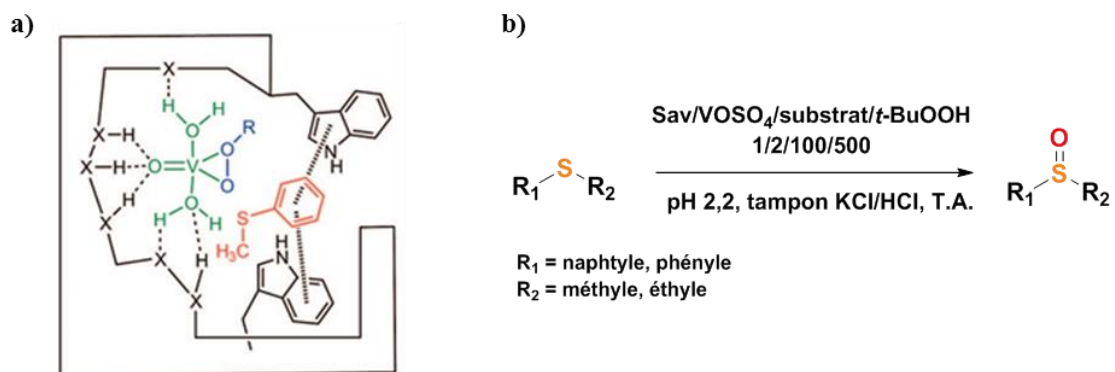


Figure I-36 : Incorporation de VOSO₄ dans la streptavidine (Sav) formant une sulfoxydase artificielle. **a)** Représentation schématique de l'enzyme artificielle, **b)** conditions réactionnelles de la sulfoxydation.

3-3-1-3. Sulfoxydase à base de BSA/HSA

En 2005, Gross *et al.* ont inséré un complexe de manganèse coordonné par un ligand corrole **Mn-LF** possédant deux groupements sulfonates et trois groupements perfluorés dans différentes albumines de sérum (mouton, porc, etc...) (**Figure I-37, b**).¹¹⁹ Ces groupements

permettent l'ancrage du complexe métallique *via* des interactions hydrophobes (groupements perfluorés) et hydrophiles (groupements sulfonates) avec une constante de dissociation de l'ordre du nanomolaire. Les meilleurs résultats de sulfoxydation de substrats de type thioanisole en présence d' H_2O_2 ont été obtenus avec la BSA (a). L'hybride **BSA/Mn-LF** catalyse la sulfoxydation du thioanisole avec un très bon rendement (83% soit 42 TON) soit une activité catalytique tout à fait intéressante ($0,467 \text{ min}^{-1}$) et des excès énantiomériques non négligeables (52% *S*). L'énantiosélectivité augmente avec des substrats *ortho*-halogénés mais l'activité catalytique est alors drastiquement diminuée : pour le 2-bromothioanisole, un excès énantiomérique de 74% pour l'énantiomère *S* est obtenu mais seulement 8 TON sont réalisés ($0,089 \text{ min}^{-1}$).

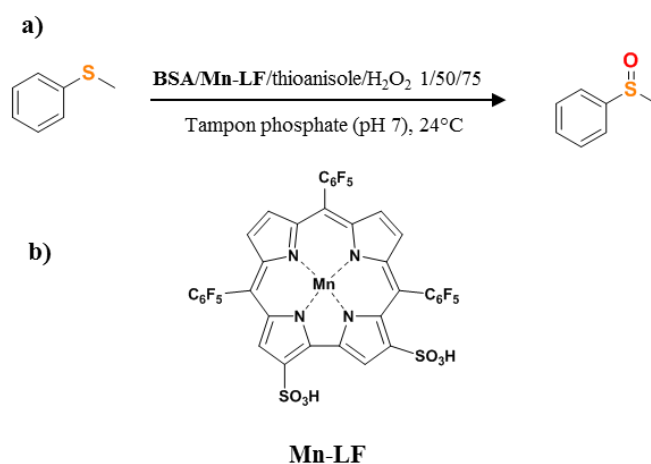


Figure I-37 : a) Conditions de sulfoxydation du thioanisole avec l'hybride **BSA/Mn-LF**.

b) Complexe employé.

Plus récemment, Liang *et al.* ont créé une sulfoxydase artificielle en insérant un complexe de Co-salen (**Co-LG**) au sein de la BSA *via* des liaisons de type hydrophobes et van der Waals (**Figure I-38, b**).¹²⁰

Cet hybride a été testé pour la réaction de sulfoxydation du thioanisole en présence d' H_2O_2 comme oxydant (a). L'hybride **BSA/Co-LG** est capable de réaliser 98 TON avec de bons excès énantiomériques (50% en faveur de l'énantiomère *R*) alors que la protéine seule ou le complexe seul n'apportent aucune énantiosélectivité (<5%). Ces excès énantiomériques peuvent atteindre 87% en faveur de l'énantiomère *R* à partir du 2-chlorothioanisole mais au détriment de l'activité qui est alors 8 fois plus faible ($0,082 \text{ min}^{-1}$ pour le thioanisole et $0,011 \text{ min}^{-1}$ pour le 2-chlorothioanisole).

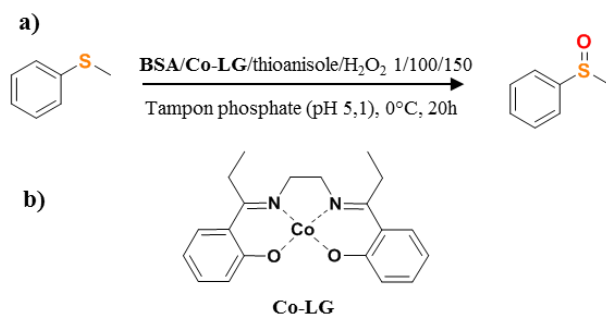


Figure 38 : a) Conditions de sulfoxydation du thioanisole avec l'hybride **BSA/Co-LG**.

b) Complexe employé.

En 2009, Ménage *et al.* ont créé une métalloenzyme artificielle en fixant un complexe de Mn-salen au sein de la protéine HSA *via* des liaisons supramoléculaires.¹²¹ Cet hybride **HSA/Mn-LH** catalyse sélectivement la production de sulfoxyde en présence de NaOCl (**Figure I-39, a et b**).

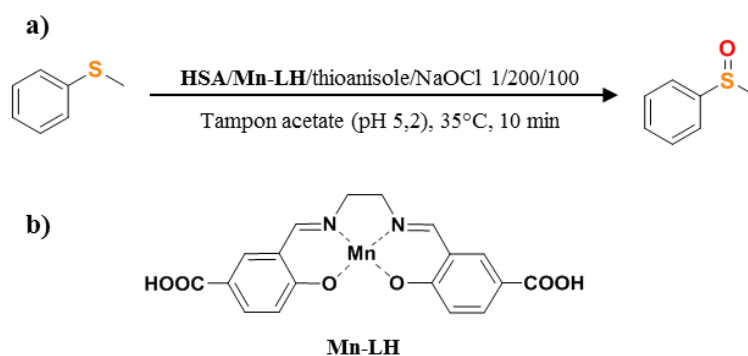


Figure I-39 : a) Conditions de sulfoxydation du thioanisole avec l'hybride **HSA/Mn-LH**.

b) Complexe employé.

Des rendements quantitatifs ont été atteints en présence de l'hybride (97%) avec une activité catalytique comparable à celle des enzymes naturelles (10 min^{-1}) et une chimiosélectivité en faveur du sulfoxyde de 100%. A l'inverse le complexe seul, bien qu'il soit actif avec un rendement de 59%, présente une sélectivité complètement différente avec la formation exclusive de la sulfone correspondante. Ces résultats montrent que l'environnement protéique joue un rôle clé dans la sélectivité de la réaction.

Le même groupe a décrit une sulfoxydase artificielle créée à partir de l'incorporation du complexe **Fe-LJ** au sein de HSA par la technique du cheval de Troie (**Figure I-40, b**).

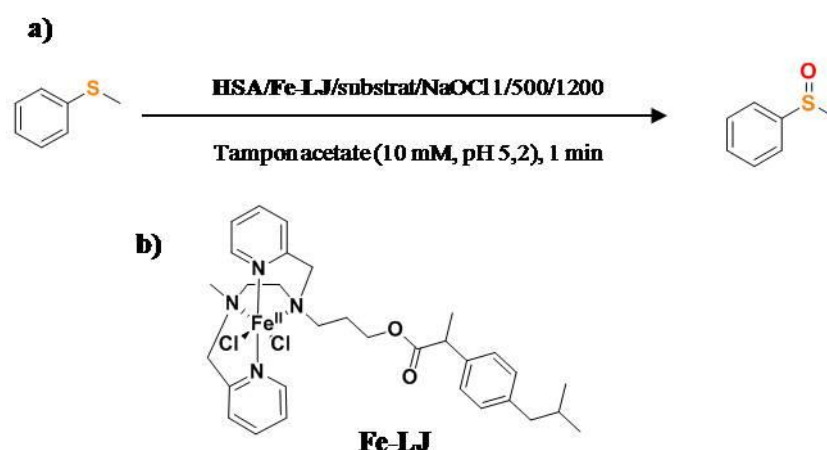


Figure I-40 : a) Conditions de sulfoxydation de thioanisole avec l'hybride **HSA/Fe-LJ**.

b) Complexe employé **Fe-LJ**.

Ce complexe est fonctionnalisé avec une molécule d'ibuprofène qui permet l'ancrage au sein de la protéine HSA.¹²² Cette métalloenzyme artificielle catalyse également la sulfoxydation du thioanisole en présence de NaOCl (**Figure I-40, a**). Lorsque le thioanisole est dissous dans le tampon acétate en présence de NaOCl, aucun produit réactionnel n'est observé. En présence du complexe **Fe-LJ** seul, seule la sulfone est produite avec un rendement de 97% (485 TON). En présence de la protéine seule, un mélange de produits réactionnels est obtenu : le sulfoxyde et la sulfone correspondants. Pour le sulfoxyde, un rendement de 45% est obtenu, soit 230 TON en sulfoxyde, avec une chimiosélectivité de 75% en faveur du sulfoxyde. En présence de l'hybride **HSA/Fe-LJ**, la sélectivité et l'activité catalytique sont améliorées avec 60% de rendement en sulfoxyde, soit 370 TON en sulfoxyde (370 min⁻¹) et une chimiosélectivité de 86% en faveur du sulfoxyde. Dans cette étude, la stabilité de l'hybride est mise en évidence : en effet, après quatre tours, la métalloenzyme artificielle a toujours une grande activité catalytique avec 64% de conversion soit 1061 TON au total (265 min⁻¹). De plus, en diminuant la température de la réaction à 4°C, la protéine est mieux préservée vis-à-vis de l'oxydant, et 1367 TON sont obtenus avec cet hybride en 4 tours successifs soit 362 min⁻¹. En comparaison, les activités catalytiques des autres sulfoxydases artificielles décrites sont beaucoup plus faibles (10 min⁻¹ pour l'hybride **HSA/Mn-LH**, 2,7 min⁻¹ pour l'hybride **Mb/Mn-LE** et <1 min⁻¹ pour les autres hybrides). La protéine joue donc deux rôles clés : un rôle de protection du complexe vis-à-vis de l'oxydant empêchant sa dégradation et un rôle d'activateur puisque l'activité catalytique et la sélectivité sont meilleures en présence de l'hybride.

3-3-1-4. Sulfoxydase à base de NikA

Une sulfoxydase artificielle a été créée par Ménage *et al.* à base de la protéine NikA. Le complexe **Fe-LK** a été incorporé par un ancrage supramoléculaire au sein de NikA avec une constante de dissociation de l'ordre du micromolaire (**Figure I-41, a**).¹¹ A partir de la structure cristallographique de cet hybride **NikA/Fe-LK** des études d'accostage moléculaire ont été entreprises afin de trouver une famille de substrats qui pourrait se fixer au sein du site actif de manière plus spécifique. Cette étude révèle une famille de molécules contenant le motif thioglycolamide $R_1-S-CH_2-C(O)-NH-R_2$, (avec R_1 et R_2 des groupements aromatiques) (**b**).

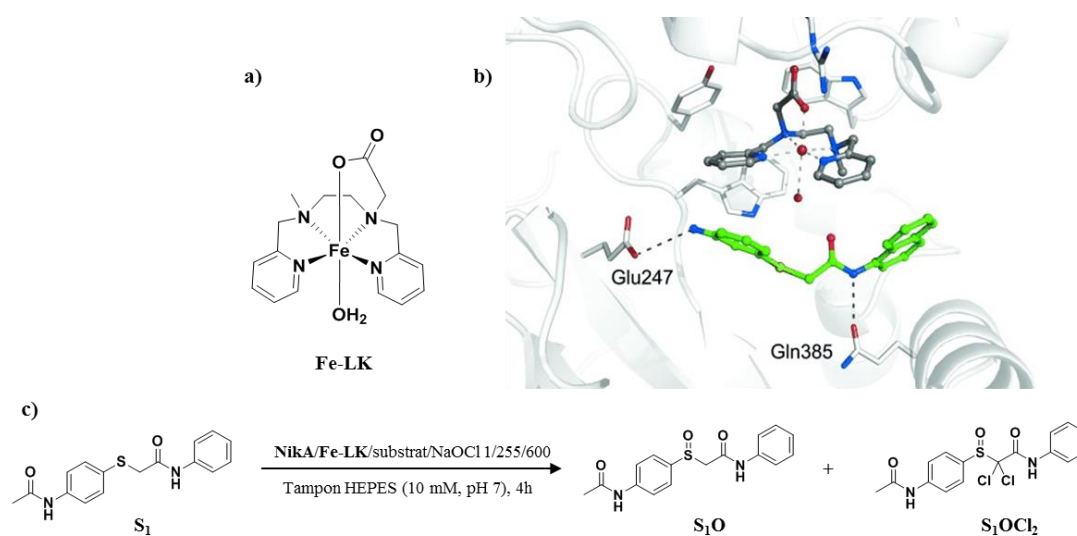


Figure I-41 : a) Complexe **Fe-LK**, b) modélisation moléculaire de la fixation d'un substrat au sein de l'hybride **NikA/Fe-LK** et c) Réaction catalysée par cet hybride.

Avec cette métalloenzyme artificielle, la réactivité de sulfoxydation de la molécule S_1 en présence de NaOCl a été testée (c). En absence de protéine, l'oxydation de S_1 ne conduit ni à la formation du sulfoxyde S_1O ni à la formation de la sulfone. Au lieu de cela, le composé S_1OCl_2 est produit. La même réaction en présence de l'hybride **NikA/Fe-LK** conduit à la formation du sulfoxyde S_1O avec une excellente chimiosélectivité (87%). Son activité catalytique, bien que plus faible que l'hybride **HSA/Fe-LJ**, est non négligeable avec $0,823 \text{ min}^{-1}$. De plus, NikA se montre être une protéine robuste puisqu'elle est capable de réaliser 173 TON en présence d'un oxydant fort, le NaOCl. Malheureusement, les excès énantiomériques de ces systèmes sont très modestes (< 10%) malgré les études d'accostage moléculaire réalisées.

3-3-1-5. Sulfoxydase à base d'anticorps

En 2004, J.P. Mahy *et al.* ont développé une nouvelle sulfoxydase artificielle à base d'anticorps.¹²³ Pour cela, ils ont inséré une microperoxydase (MP8), un octapeptide à fer hémique, au sein d'un anticorps 3A3 par liaisons supramoléculaires (**Figure I-42, b**). Généralement, l'efficacité catalytique de ces anticorps à base de porphyrine est environ 4 fois moins élevée que les peroxydases naturelles¹²⁴ mais, dans ce cas précis, l'histidine 18 du peptide joue le rôle de ligand proximal de l'atome de fer permettant son activation.

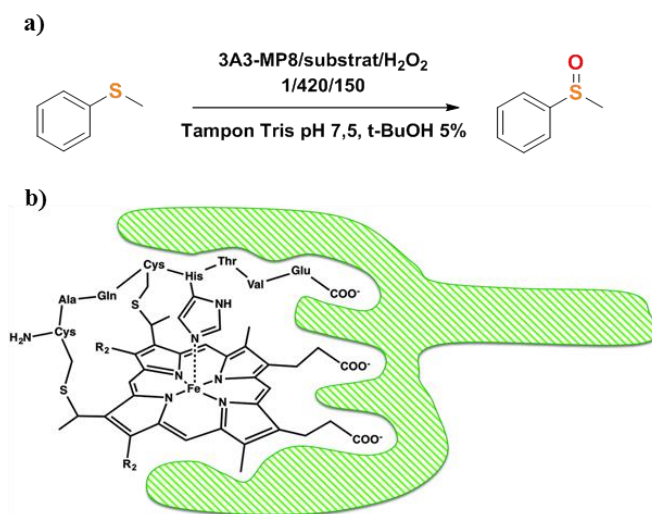


Figure I-42 : a) Conditions de sulfoxydation du thioanisole avec l'hybride 3A3-MP8/Fe-LL.

b) Vue schématique de l'hybride.

Dans cette étude, les hybrides ont été étudiés pour la sulfoxydation du thioanisole en présence d' H_2O_2 (a). Dans un premier temps, en absence de *t*-BuOH, les hybrides **3A3-MP8** catalysent la formation du sulfoxyde exclusivement avec un rendement de 30% et un excès énantiomérique de 23% en faveur de l'énantiomère *R* alors que MP8 seule possède une activité catalytique 3 fois plus faible et un excès énantiomérique de seulement 4% (*R*). L'ajout de co-solvant, tel que *t*-BuOH, permet une meilleure solubilisation des substrats permettant d'améliorer l'activité catalytique des catalyseurs et leur sélectivité. En effet, en présence de 5% de *t*-BuOH dans le milieu réactionnel, l'hybride **3A3-MP8/Fe-LL** atteint un rendement de 49% et des excès énantiomériques de 45% (*R*) alors que MP8 seule possède toujours une activité catalytique et des excès énantiomériques plus faibles (23% de rendement et 5% *ee*). L'incorporation de MP8 au sein de l'anticorps 3A3 permet non seulement d'améliorer l'activité catalytique d'un facteur 2 ou 3 mais aussi d'améliorer grandement

l'énantiosélectivité de la réaction grâce à l'apport de contraintes stériques dues à la 2nde sphère de coordination de l'hybride.

Un autre hybride à base d'anticorps a été développé par le même groupe en 2010.¹²⁵ Dans cette étude, des conjugués métalloporphyrines-estradiol ont été synthétisés et insérés au sein d'un anticorps, 7A3, possédant un site de reconnaissance spécifique d'estradiol (**Figure I-43, b**). Deux hybrides à base de fer ou de manganèse ont été étudiés dans la réaction de sulfoxydation du thioanisole en présence d'H₂O₂ (**a**).

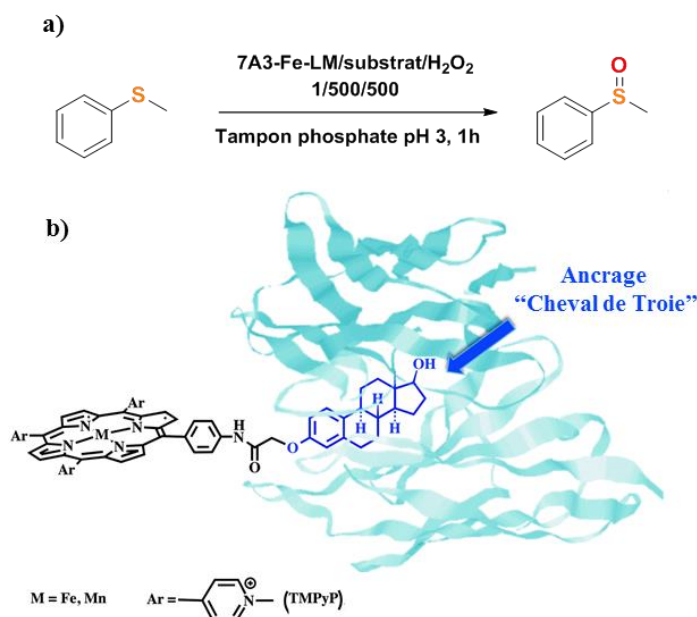


Figure I-43 : a) Conditions de sulfoxydation du thioanisole avec l'hybride 7A3/Fe-LM. b) Vue schématique de l'hybride.

L'hybride ou le complexe seul à base de manganèse ne conduit à aucune oxydation du thioanisole. Ce résultat n'est pas surprenant en sachant que les complexes de manganèse porphyriniques ont été reportés pour être des catalyseurs efficaces dans la réaction de dismutation d'H₂O₂ en H₂O et O₂. En revanche, avec l'hybride à base de fer, 44 μM de sulfoxyde sont formés chimiosélectivement (< 2% de rendement) avec un excès énantiomérique assez faible de 10%. Bien que l'hybride soit 6 fois plus actif que le complexe seul, les rendements obtenus sont assez faibles montrant la difficulté de concevoir des hybrides efficaces en milieu aqueux.

3-3-1-6. Conclusion

Tableau 2 : Récapitulatif des réactifs de sulfoxydation du thioanisole.

<i>Ref</i>	<i>complexe</i>	<i>protéine</i>	<i>oxydant</i>	<i>ee%</i>	<i>R%</i> (<i>TON</i>)	<i>TOF</i> (<i>min⁻¹</i>)	<i>Structure</i> <i>RX</i>
126	-	NDO	H ₂ O ₂	98 (<i>S</i>)	100 (< 200)	1,18	oui
117	VO₄³⁻	phytase	H ₂ O ₂	66 (<i>S</i>)	100 (550)	-	-
109	Cr-salophen	Mb (H64D-A71G)	H ₂ O ₂	13 (<i>S</i>)	-	0,08	-
127	Mn-LE	Mb(A71G)	H ₂ O ₂	27 (<i>R</i>)	-	2,72	oui
118	VO(SO₄)	streptavidine	<i>t</i> -BuOOH	46 (<i>R</i>)	94 (47)	0,20	-
118a	VO(SO₄)	streptavidine	<i>t</i> -BuOOH	90 (<i>R</i>)	96 (48)	0,20	-
119	Mn-LF	BSA	H ₂ O ₂	52 (<i>S</i>)	83 (42)	0,47	-
120	Co-LG	BSA	H ₂ O ₂	50 (<i>R</i>)	96 (96)	0,08	-
121	Mn-LH	HSA	NaOCl	0	97 (97)	10,0	-
122	Fe-LJ	HSA	NaOCl	0	64 (1362) ^c	362	-
11b	Fe-LK	NikA	NaOCl	10(<i>R</i>)	69 (176)	0,73	oui
123	Fe-LL	Anticorps 3A3	H ₂ O ₂	45 (<i>R</i>)	49 (74)	0,82	-
125	Fe-LM	Anticorps 7A3	H ₂ O ₂	10 (<i>R</i>)	2 (9)	0,15	-

^[a] Substrat : éthylthioanisole. ^[b] Substrat : S1. ^[c] en 4 runs.

Les sulfoxydases artificielles sont les métalloenzymes artificielles les plus étudiées dans le domaine des réactions d'oxydation. La grande diversité des protéines utilisées (phytase, Mb, streptavidine, BSA, NikA, HSA, anticorps), du métal (Fe, Co, Mn, Cr) et de l'oxydant (H₂O₂, NaOCl, *t*-BuOOH) permet d'obtenir un large panel de nouveaux biocatalyseurs possédant chacun des propriétés très intéressantes. Une enzyme naturelle, la NDO, est capable de

catalyser la sulfoxydation du thioanisole en présence d' H_2O_2 avec de très bonnes chimio-, régio- et énantiosélectivités (98% en faveur de *S*) et une activité catalytique de $1,18 \text{ min}^{-1}$. En comparaison, en s'inspirant de ces enzymes naturelles et en concevant de nouvelles métalloenzymes artificielles bio-inspirées, de nombreuses améliorations ont pu être apportées : (i) la formation de l'autre énantiomère (*R*), (ii) l'amélioration du nombre de TON réalisé par l'hybride, (iii) l'amélioration du TOF ou encore (iv) l'amélioration de la stabilité (**Tableau 2**).

3-3-2. Epoxydation

L'époxydation d'alcènes est une des réactions les plus importantes dans l'industrie et dans la recherche académique. Les époxydes sont d'importants intermédiaires réactionnels dans l'industrie chimique, en particulier pour la synthèse de polymères variés (polyglycols, polyamides, polyuréthanes, etc...),¹²⁸ dans les industries de chimie fine, comme la synthèse d'un intermédiaire époxyde dans la production de l'atazanavir (inhibiteur de protéase du VIH) (**Figure I-1**).⁵ Dans ce cadre, la conception de métalloenzymes artificielles pour l'époxydation d'alcènes paraît être une méthode prometteuse. Pour ces études, le styrène a été utilisé comme substrat de référence.

Le groupe de P. Soumilion a substitué l'atome de zinc de l'anhydrase carbonique (hCA) par un atome de manganèse pour générer une époxydase artificielle.¹²⁹ Cet hybride catalyse l'époxydation du styrène en utilisant H_2O_2 comme oxydant avec des rendements et des excès énantiomériques modérés (29% de rendement et 40% d'*ee* en faveur de l'énantiomère *R*) (**Figure I-44**).

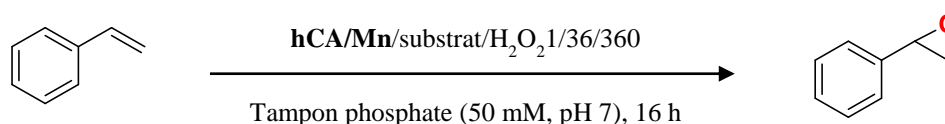


Figure I-44 : Conditions d'époxydation du styrène avec l'hybride **hCA/Mn**.

Le groupe de J.P. Mahy a décrit l'association d'un complexe de manganèse **Mn-LN** au sein de la xylanase 10A (XLnA) pour former une nouvelle métalloenzyme artificielle catalysant l'époxydation énantiosélective du styrène par KHSO_5 (**Figure I-45**). Bien que modérée, son activité catalytique est l'une des meilleures observées dans la catégorie des époxydases

artificielles ($0,363 \text{ min}^{-1}$). L'insertion du complexe au sein de la XLnA permet à la fois de le protéger de l'auto-oxydation et d'induire une énantiosélectivité.

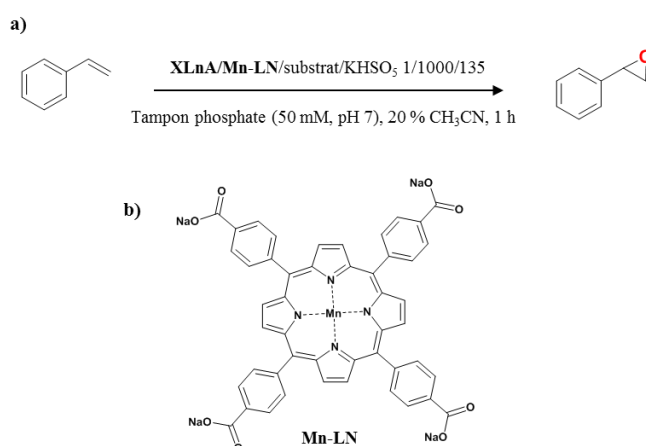


Figure I-45 : a) Conditions d'époxydation du styrène avec l'hybride XLnA/Mn-LN.

b) Complexe employé Mn-LN.

Celle-ci, dans le cas du styrène, est assez faible (8,5% en faveur de l'énantiomère *S*) mais elle peut atteindre jusqu'à 80% (*R*), dans les cas du 4-méthoxystyrène, pour une activité catalytique similaire.¹³⁰

Tableau 3 : Récapitulatif des réactivités d'époxydation du styrène.

Ref	complexe	protéine	oxydant	ee %	R% (TON)	TOF (min^{-1})	Structure RX
131	-	SMO	O ₂	100 (<i>S</i>)	100 (1)	0,600	oui
129	Mn	hCA	H ₂ O ₂	40(<i>R</i>)	29 (5)	0,005	oui
130	Mn-LN	XLnA	KHSO ₅	8,5 (<i>S</i>)	17 (23)	0,383	-

Les époxydases artificielles sont moins étudiées que les sulfoxydases artificielles, ce qui est certainement dû à la difficulté à réaliser des réactions d'époxydation de façon sélective. En comparaison, l'enzyme naturelle, la styrène monooxygénase (SMO), est capable d'obtenir l'époxyde avec un rendement quantitatif et un excès énantiomérique de 100% en faveur de l'énantiomère *S*. D'autres études sont nécessaires pour créer des systèmes catalytiques beaucoup plus efficaces pour qu'ils soient intéressants d'un point de vue industriel. Toutefois,

la conception de métalloenzymes artificielles donne accès à l'obtention des deux énantiomères du produit contrairement à l'enzyme naturelle.

3-4. Optimisation des métalloenzymes artificielles par évolution dirigée

Le développement des biotechnologies permet d'envisager de nouvelles évolutions pour les métalloenzymes artificielles. L'environnement protéique peut être modulé grâce à l'utilisation de l'évolution dirigée, par exemple.¹³² Elle vise à modifier un ou plusieurs acides aminés de la protéine afin d'apporter une plus grande diversité qu'à l'état initial. Ces modifications sont totalement aléatoires en termes d'acide aminé mais localisées à des positions spécifiques choisies au sein de la protéine. Ainsi, de nouvelles métalloenzymes artificielles ont pu être élaborées présentant de meilleures activités catalytiques et sélectivités ou de nouvelles réactions non existantes dans la Nature. Dans cette partie, j'ai choisi de détailler les exemples les plus marquants dans l'optimisation des métalloenzymes artificielles par évolution dirigée même si ce ne sont pas des exemples en catalyse d'oxydation.

3-4-1. Optimisation de la streptavidine

Les études concernant l'utilisation de la (strept)avidine comme hôte pour la création d'une métalloenzyme artificielle ont débuté en 1978.⁹⁶ Wilson et Whitesides ont conçu un hybride catalysant l'hydrogénation de l'acide 2-acétamidoacrylique en *N*-acétylalanine avec des rendements quantitatifs et des excès énantiomériques atteignant les 44%.

En s'inspirant de cette étude pionnière, Ward *et al.* ont identifié deux nouvelles hydrogénases artificielles optimisées par mutation de la sérine 112 en différents acides aminés permettant l'amélioration des activités catalytiques et surtout des excès énantiomériques (*ee* max : 57% en faveur de *S* et 56% en faveur de *R*).¹³³

Par la suite, deux nouvelles métalloenzymes artificielles, catalysant l'hydrogénation énantiosélective de dérivés de l'acétophénone, ont été conçues par le même groupe.¹³⁴ Dans cette étude, deux complexes, **Ru-LO** et **Ru-LP**, sont insérés au sein de la streptavidine *via* la stratégie du Cheval de Troie (**Figure I-46, b**).

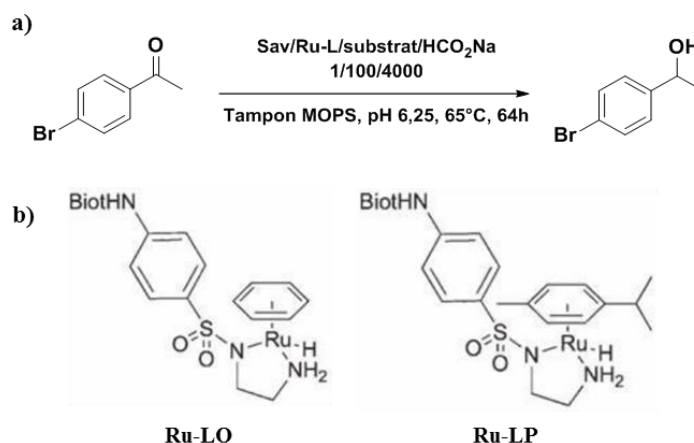


Figure I-46 : a) Conditions réactionnelles de l'hydrogénation du 4-bromoacétophénone avec l'hybride Sav/Ru-LO ou Ru-LP. b) Complexes employés Ru-LO et Ru-LP.

Pour aller encore plus loin, en se basant sur la structure cristallographique du complexe **Ru-LP** au sein de la streptavidine, ils ont mis en évidence que la lysine121 et la leucine 124 étaient des positions qui pourraient interagir avec le complexe métallique et avec le substrat. Une librairie de mutants a donc été préparée sur ces deux positions à partir de Sav(WT), Sav S112A et Sav S112K en utilisant une technique d'évolution dirigée. Le criblage a été facilité par l'immobilisation des différents mutants sur une colonne de sépharose biotinyllée. Les différentes combinaisons sont ensuite testées dans le cadre de la catalyse d'hydrogénation énantiosélective de la 4-bromoacétophénone en présence d'acide formique comme source d'atome d'hydrogène (a). Avec le complexe **Ru-LP**, une seule mutation (L124V) conduit à la production de l'alcool correspondant avec des excès énantiomériques atteignant 91% en faveur de l'énantiomère *R*. Avec le complexe **Ru-LO**, la mutation K121N permet d'obtenir l'autre énantiomère avec des excès énantiomériques atteignant les 75%. Cette étude permet de mettre en avant tous les avantages de l'optimisation chimio-génétique : la réactivité et la sélectivité peuvent être modulées en jouant à la fois sur le complexe et/ou sur la protéine offrant de nombreuses possibilités d'optimisation des métalloenzymes artificielles.

3-4-2. Vers une métalloenzyme artificielle avec des cinétiques comparables aux enzymes natives

Deux objectifs d'évolution sont de créer des métalloenzymes artificielles possédant des activités catalytiques comparables à celles des enzymes naturelles et catalysant des réactions

non naturelles. En 2016, le groupe d'Hartwig a reconstitué une métalloenzyme artificielle à base d'un complexe métallique d'iridium porphyrinique qui possède des paramètres cinétiques équivalents aux enzymes naturelles.¹³⁵

Ces travaux sont précurseurs dans l'élaboration d'une métalloenzyme artificielle hautement active, très efficace et très sélective en réalisant une réaction non existante dans la Nature, l'insertion énantiosélective de carbène. Pour obtenir de telles performances, diverses mutations ont été introduites au niveau du site actif par évolution dirigée (**Figure I-47, b**). La métalloenzyme de référence, **Cyt.P450/Ir(Me)-PIX** (dont la cystéine 317 a été mutée en glycine pour faciliter l'accommodation du ligand axial méthylé de l'iridium), ainsi que des mutants ont été testés en conditions standard (**a**). L'hybride de référence possède une activité catalytique et des excès énantiomériques très faibles (0,13 min⁻¹ et 14% d'*ee*). En revanche, avec le quadruple mutant Ir(Me)-PIX CYP 119 (C317G, T213A, L69V et V254L), cette activité est 330 fois plus grande (43 min⁻¹) et les excès énantiomériques atteignent 94%.

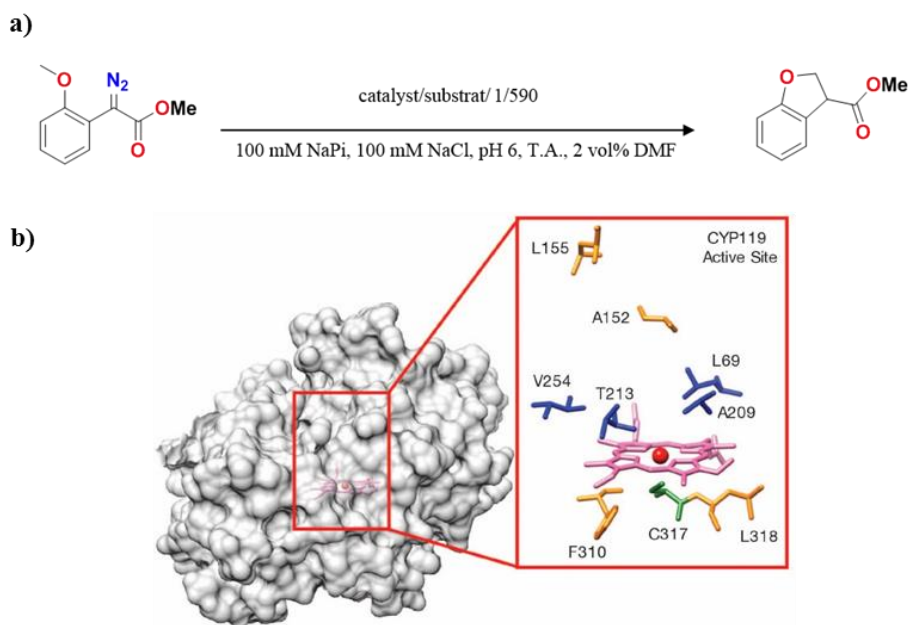


Figure I-47 : a) Conditions réactionnelles standard avec l'hybride **Cyt.P450/Ir(Me)-PIX**. b) Structure du Cyt. P450 CYP119 sauvage (code PDB 1l07). A gauche, structure complète de l'enzyme native. A droite, résidus du site actif modifiés lors de l'évolution dirigée.

Cette étude montre l'intérêt de combiner les avantages de la biocatalyse et de la catalyse homogène : en effet, le changement de métal conduit à une réactivité abiotique et l'évolution dirigée des acides aminés du site actif permet de synthétiser une métalloenzyme artificielle

possédant des propriétés catalytiques exceptionnelles que ce soit en termes d'efficacité ou de sélectivité.

3-4-3. Optimisation de métalloenzymes artificielles pour la réaction de métathèse *in vivo*

Récemment, Ward *e al.* ont créé des métalloenzymes artificielles *in vivo* en insérant un complexe de ruthénium biotinylé au sein de la Sav(WT) et de différents mutants obtenus par évolution dirigée.¹³⁶ Ces différents mutants ont été surproduits avec une séquence signal N-terminale qui impose la translocation de la protéine du cytoplasme vers le périplasma de la cellule. Cela permet la création de la métalloenzyme directement dans la cellule par incubation du complexe dans le milieu de culture (le complexe à accès au périplasma et non au cytoplasme) et de tester son activité *in vivo* (**Figure I-48**). Ce protocole de criblage est grandement simplifié comparé aux systèmes traditionnels : la purification de l'hybride formé n'est pas nécessaire puisque le complexe seul est inhibé par les différents métabolites de la cellule.

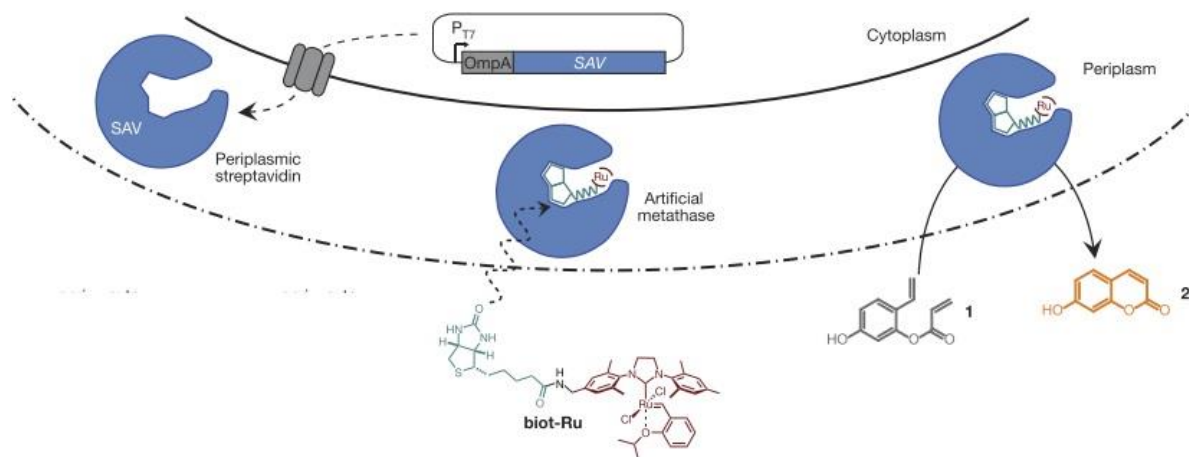


Figure I-48 : Représentation schématique de l'ancrage du complexe au sein de la protéine périplasmique et de la réaction catalysée.

Pour cela, les auteurs ont inséré un complexe biotinylé de type Hoveyda-Grubbs de seconde génération dans des milieux de culture d'*Escherichia Coli* surproduisant la streptavidine dans le périplasma (**Figure I-48**). Plus de 3 000 mutants ont été générés par mutagenèse dirigée et criblés. Le meilleur mutant obtenu pour cette réaction est un quintuple mutant (V47A-N49K-

T114Q-A119G-K121R) qui possède une activité catalytique 5,4 fois plus importante que la protéine sauvage. Les TON obtenus ne peuvent pas être directement comparés avec les autres hybrides décrits précédemment puisque le nombre de TON est donné par cellule.

3-5. Conclusion

Au fil des années, les métalloenzymes artificielles deviennent de plus en plus évoluées avec des propriétés catalytiques se rapprochant petit à petit de celles des enzymes naturelles. Le développement des technologies, autour de la biologie de synthèse, permet d'enrichir les possibilités d'évolution de ces systèmes avec un gain non négligeable en sélectivité et une expansion de la gamme de réactions qui ne sont pas accessibles avec des enzymes natives. Des avancées majeures ont été réalisées très récemment avec la possibilité de réaliser des réactions abiotiques *in vivo* ce qui ouvre un champ de possibilités immense comme, par exemple, la création d'un métabolisme entier de réactions non naturelles. Bien que de nombreux progrès aient été faits pour développer ces nouveaux systèmes, il existe encore quelques aspects à améliorer pour être performants à l'échelle industrielle. Notamment, l'amélioration de la stabilité des hybrides va constituer une avancée majeure pour leurs applications biotechnologiques. Pour cela, de nombreuses techniques d'immobilisation d'enzymes ont été développées et cela constitue mon prochain chapitre.

4. L'immobilisation d'enzymes

L'utilisation d'enzymes purifiées sous leur forme native est souvent limitée à l'échelle industrielle par différents facteurs comme leur coût, leur purification en grande quantité, leur faible stabilité et leur difficulté de récupération et de réutilisation. Pour surmonter ces inconvénients, une des solutions envisagées repose sur l'hétérogénéisation de ces biocatalyseurs par différentes techniques d'immobilisation d'enzymes.^{12, 137} Cette technologie est en plein essor puisqu'elle permet de prolonger la durée de vie des enzymes en leur conférant de nouvelles propriétés physiques, voire chimiques. Ces enzymes immobilisées pourraient donc être beaucoup plus stables, plus facilement recyclables et réutilisables, facilement séparables du milieu réactionnel ou encore plus actives catalytiquement en fonction de la technique d'immobilisation choisie. Ainsi, l'enzyme peut donc être utilisée dans des conditions plus drastiques que dans son état natif (températures élevées, solvants organiques, gamme de pH élargie, etc...).

La technologie d'immobilisation d'enzymes a été découverte par J. Nelson et E. Griffin en 1916. Ces auteurs ont montré que quand l'invertase était physiquement adsorbée sur du charbon, elle conservait son activité catalytique d'hydrolyse du sucrose.¹³⁸ Depuis, de nombreux travaux ont été réalisés sur cette technologie et de nombreuses applications en découlent au niveau industriel. Cette technologie peut être classée selon quatre catégories : l'immobilisation sur support, l'encapsulation, l'inclusion et la réticulation.

4-1. L'immobilisation sur surface

4-1-1. Adsorption

Cette méthode est la plus simple et la plus économique. Elle repose sur la rétention de l'enzyme à la surface d'un support, minéral ou organique, par l'intermédiaire de liaisons faibles (hydrophobes, van der Waals, ioniques ou liaisons hydrogène) (**Figure I-49**). Une très grande diversité de supports a été utilisée possédant des propriétés physico-chimiques très variées (verre, quartz, collagène, cellulose, etc...).¹³⁹

Avec cette technique, il n'est pas nécessaire d'effectuer des modifications chimiques sur l'enzyme ou sur le support contrairement à la méthode covalente. De plus, elle est très facile à mettre en œuvre et non dénaturante. En revanche, la stabilisation de l'enzyme étant moins importante, sa désorption est facilitée au cours des cycles catalytiques.

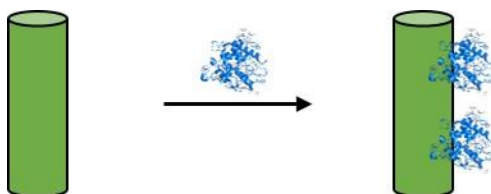


Figure I-49 : Immobilisation d'enzymes par adsorption.

En 2007, Hudson et Magner ont immobilisé une chloroperoxydase sur un support mésoporeux à base de groupements organosilane.¹⁴⁰ Certes, l'enzyme immobilisée possède une moins bonne activité catalytique que l'enzyme native (75%) mais elle peut être recyclée et réutilisée 20 fois sans perte d'activité grâce à son immobilisation. Cette étude met donc en avant l'intérêt de développer une biocatalyse hétérogène afin de pouvoir recycler l'enzyme.

4-1-2. Liaisons covalentes

Cette technique repose sur la formation de liaisons covalentes entre l'enzyme et le support utilisé. Ces liaisons irréversibles se forment entre les acides aminés de la protéine et les groupes réactifs du support. De nombreux types de supports ont été développés à ce jour : supports minéraux ou organiques, naturels ou synthétiques, possédant des groupements réactifs très variés comme les azotures et chlorures d'acyle, les diazoïques, les cyanates, les iodures d'alkyle, les aldéhydes ou encore les époxydes.¹⁴¹ Généralement, ces groupements réactifs sont incorporés sur le support par l'intermédiaire d'un traitement chimique avant la réaction d'immobilisation de l'enzyme.

Cette méthodologie est illustrée par les travaux réalisés en 2008 par Guisà *et al.* où la lipase de *Yarrowia lipolytica* (YLL) est attachée covalamment à un support (CNBr)-agarose (**Figure I-50**).¹⁴² Dans cette étude, l'agarose est d'abord fonctionnalisé à partir du bromure de cyanogène avant la fixation de l'enzyme. Avec cette méthodologie, 99% de la protéine est fixée sur le support utilisé et le taux de relargage est très faible. Une meilleure stabilité de la protéine vis-à-vis de la température est observée. Malheureusement, cela inhibe complètement

son activité catalytique (2% d'activité). En effet, la liaison covalente de la protéine sur support peut entraîner une modification de sa conformation en trois dimensions, et donc impacter la structure du site actif et son activité.

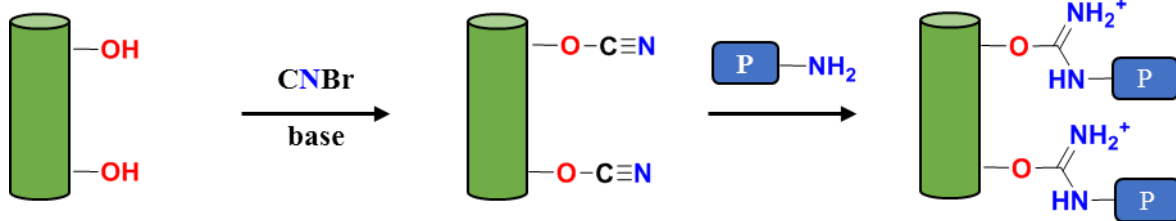


Figure I-50 : exemple d'immobilisation sur support par liaison covalente.

4-2. Encapsulation

Cette méthode consiste à encapsuler une enzyme à l'intérieur d'une membrane semi-perméable. Elle protège l'enzyme de l'environnement extérieur mais son application est limitée par la taille des substrats qui doivent être capables de traverser les pores de la membrane. En 2008, Zhang a internalisé la β -glucuronidase dans une capsule hybride à base d'alginate/protamine/silice (APSi) (Figure I-51).¹⁴³

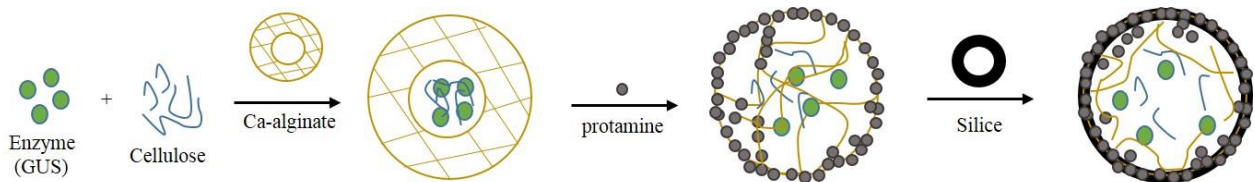


Figure I-51 : Encapsulation de l'enzyme β -glucuronidase par la méthodologie de Zhang.

L'activité d'hydrolyse de la Baicaline en Bacaléine a été étudiée en comparant les propriétés catalytiques et physiques de l'enzyme libre et de l'enzyme immobilisée. Concernant la stabilité, l'enzyme immobilisée s'avère beaucoup plus stable vis-à-vis de la température et des variations de pH (à 50°C, 95% de rétention d'activité pour l'enzyme immobilisée contre 50% pour l'enzyme libre et à pH 4, 85% de rétention d'activité pour l'enzyme immobilisée contre 0% pour l'enzyme libre). De plus, l'enzyme immobilisée peut être stockée à température ambiante au moins 26 jours en gardant une activité catalytique très intéressante (90% de rétention d'activité) alors que l'enzyme libre ne conserve que 4% de l'activité initiale. Cette enzyme immobilisée peut aussi être réutilisée au moins 10 fois sans perdre de son efficacité.

4-3. L'inclusion

Similaire à l'encapsulation, cette méthodologie se définit par l'internalisation d'une enzyme, mais cette fois-ci, au sein d'une matrice poreuse (**Figure I-52**).^{144, 145} Les liaisons impliquées dans la stabilisation de l'enzyme peuvent être covalentes ou non. Les pores de la matrice peuvent être ajustés afin d'éviter au maximum la perte de l'enzyme.

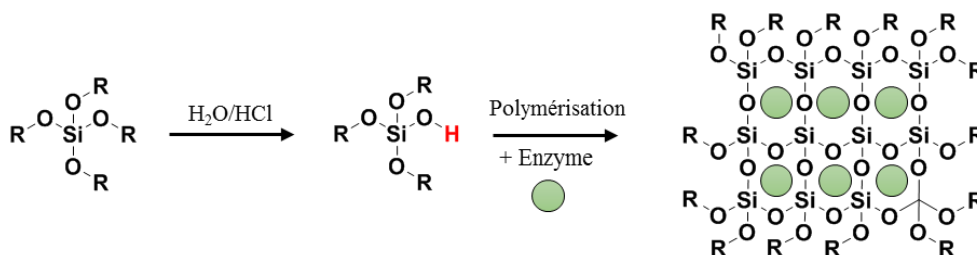


Figure I-52 : Technique d'immobilisation d'enzymes : inclusion dans un réseau polymère.

Par exemple, le groupe de M. Sommerhalter a immobilisé la chloroperoxydase dans une matrice à base de tétraméthoxysilane. Les performances catalytiques de l'enzyme immobilisée ont été étudiées sur la réaction de peroxydation du pyrogallol en présence d'O₂.¹⁴⁶ En comparaison à l'enzyme libre en solution, l'activité catalytique de l'enzyme immobilisée n'est seulement que d'environ 10% à cause notamment, des interactions faibles présentes entre l'enzyme et le support qui entraînent son relargage au cours de la réaction, de l'exposition au méthanol en début de réaction, des nombreuses interactions physico-chimiques entre la matrice et les substrats ou encore de la difficulté d'accessibilité pour les substrats et produits à travers les pores de 3 nm. En revanche, même si l'activité décroît au cours du temps, cette enzyme immobilisée peut être réutilisée trois fois en remplaçant le milieu réactionnel, composé du tampon et des produits réactionnels, avec une nouvelle solution de tampon et de substrats. Les matrices les plus utilisées sont généralement à base de polyacrylamide, d'alginate, d'amidon ou encore de silice.¹⁴⁷ Cette méthodologie peut s'appliquer à une multitude d'enzymes en choisissant avec attention l'interaction entre la protéine et la matrice (covalente ou non). Les supports utilisés peuvent être modifiés en termes de propriétés physico-chimiques (formes adaptables). En revanche, la matrice formée est très compacte ce qui limite beaucoup la diffusion des différentes molécules (substrats et produits) au sein de la matrice. De plus, certaines conditions de polymérisations peuvent induire la dénaturation des enzymes (pH élevés, agents dénaturants, radicaux, etc...).

4-4. Réticulation d'enzymes

Dans les années 1960, les études sur la chimie des protéines en phase solide ont mené à la découverte de la technologie de réticulation d'enzymes. Cette technologie utilise un agent bifonctionnel (comme le dialdéhyde glutaraldéhyde) pour lier covalamment des enzymes entre elles en réagissant préférentiellement sur des résidus lysine.^{12, 148} La réticulation d'enzymes peut être catégorisée en deux sous-groupes : la réticulation d'agrégats d'enzymes (CLEA ou Cross-Linked Enzyme Aggregates) et la réticulation d'enzymes sous forme cristallisée (CLEC ou Cross-Linked Enzymes Crystals) (**Figure I-53**). La réticulation d'enzymes ne nécessite pas l'emploi de support, ce qui est déjà un précieux avantage (coût, conditions de greffage, choix du support, etc...). De ce fait, elle offre une concentration en catalyseur par mg de matériau la plus élevée puisque le matériau n'est composé que de catalyseur. L'accès au catalyseur par les réactifs et substrats est également facilité en absence de support et de polymère d'inclusion. Enfin, elle favorise grandement la stabilisation de l'enzyme utilisée, grâce à la formation de liaisons covalentes qui minimisent la perte de la protéine au cours de la réaction.

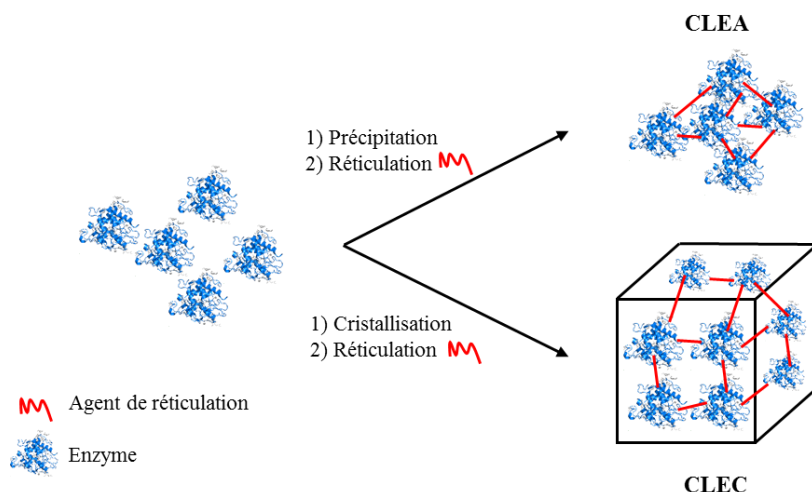


Figure I-53 : Réticulation d'enzymes : CLEA (Cross-Linked Enzymes Aggregates) et CLEC (Cross-Linked Enzyme Crystals).

Cependant, la détermination des conditions réactionnelles pour la cristallisation ou la précipitation de l'enzyme sont très dépendantes de l'enzyme choisie et doivent donc être déterminées pour chaque enzyme.

4-4-1. CLEA

La réticulation d'agrégats d'enzymes est une méthodologie simple et économique. L'addition de sels (par exemple, le sulfate d'ammonium) ou de solvants organiques (miscibles dans l'eau) conduit à la précipitation de la protéine sous forme d'agrégats sans la dénaturer. Bien que cette méthodologie soit assez simple, la détermination des conditions de précipitation est dépendante de l'enzyme utilisée. Ces agrégats sont ensuite stabilisés lors de l'ajout d'un agent bifonctionnel. En comparaison aux CLEC, les CLEA permettent de s'affranchir de l'étape de cristallisation. Il n'est donc pas nécessaire d'obtenir une enzyme parfaitement pure ce qui facilite son emploi en milieu industriel.¹⁴⁹ La majorité des CLEA qui ont été reportés impliquent principalement des réactions d'hydrolyse (lipase, invertase, hydroxynitrile lyase) ou de réductions (alcool déshydrogénase).^{137, 150} Ces CLEA possèdent déjà de nombreuses applications industrielles (médicaments, peintures, additifs, biocapteurs, etc...).

Par exemple, Sheldon et Cao se sont intéressés à améliorer les propriétés catalytiques et physiques de la pénicilline G acylase (enzyme permettant la synthèse de l'ampicilline).¹⁵¹ En effet, la tolérance de l'enzyme libre vis-à-vis des solvants organiques étant faible, l'immobilisation paraissait être une solution intéressante pour améliorer ses propriétés. L'enzyme immobilisée a donc pu être utilisée dans de nombreux solvants organiques (CH₃CN, *t*-BuOH, 1,2-diméthoxyéthane, etc...) ce qui facilite la dissolution des substrats et améliore l'efficacité catalytique.

L'utilisation de CLEA pour réaliser des réactions d'oxydation est toutefois peu développée. Arends *et al.* ont synthétisé un CLEA de 3-phytase, incubé avec du vanadium, pour le tester en tant que biocatalyseur dans la réaction de sulfoxydation asymétrique du thioanisole en présence d'H₂O₂.¹⁵² Les auteurs ont démontré que l'enzyme immobilisée était aussi efficace que l'enzyme libre (95% de conversion et jusqu'à 60% *ee*). De plus, les propriétés physiques de l'enzyme immobilisée ont pu être largement améliorées comparées à celles de l'enzyme libre. Elle peut ainsi être utilisée : (i) en présence de différents solvants tels que le méthanol, l'éthanol ou encore CH₃CN, (ii) trois fois d'affilées sans perte d'activité significative, (iii) à des pH plus acides (<4) ou encore (iv) à des températures plus élevées (jusqu'à 80°C).

4-4-2. CLEC

Une méthodologie originale, développée plus tard dans les années 1990, est la réticulation de cristaux d'enzymes afin de concevoir de nouveaux nanomatériaux.¹⁵³ Son développement fut assez lent notamment à cause de la difficulté à cristalliser des enzymes. En revanche, les progrès effectués dans le domaine des biotechnologies et de la robotisation ont permis de s'affranchir de cette barrière technologique. Les cristaux de protéines représentent un assemblage de protéines sous forme solide et de façon ordonnée. Chaque cristal est constitué de pores internes qui constituent des canaux de solvants. Cette particularité, uniquement présente dans les CLEC, présente l'avantage de faciliter la diffusion des substrats et des produits jusqu'au site actif de l'enzyme. De plus, ces cristaux peuvent être étudiés par diffraction des rayons X afin de les caractériser précisément. Les précurseurs dans ce domaine, St. Clair et Navia, ont mis en évidence l'amélioration de la stabilité de la thermolysine après réticulation.¹⁵⁴ Ce «CLEC thermolysine» garde toute son activité catalytique après quatre jours d'incubation à 65°C alors que l'enzyme libre perd plus de 80% de son activité en seulement quelques heures.

La technologie CLEC a déjà été appliquée en résolution cinétique,¹⁵⁵ en synthèse de peptides (subtilisine, thermolysine),¹⁵⁶ dans le développement de biocapteurs (glucose oxydase)¹⁵⁷ et dans quelques réactions d'oxydation.¹⁵⁸ En revanche, il n'existe qu'un seul exemple avec des métalloenzymes artificielles développé par le groupe d'Ueno. Le CLEC de métalloenzymes artificielles est composé d'un complexe de ruthénium [**Ru(benzène)(Cl₂)**] inséré au sein de cristaux de lysozyme quadratiques (T) ou orthorhombiques (O). Ces cristaux sont ensuite immobilisés, *via* l'ajout de glutaraldéhyde, pour produire les **CLEC T/Ru** ou les **CLEC O/Ru**. Ces CLEC ont été testés dans la catalyse de réduction énantiosélective de dérivés de l'acétophénone et comparés à l'hybride en solution **HEWL/Ru (Figure I-54)**.¹⁵⁹ Le meilleur résultat a été observé sur la réduction de la propiophénone en présence de formiate de sodium comme source d'hydrogène. L'hybride en solution n'est capable de produire que 8% de l'alcool correspondant avec un excès énantiomérique faible de 7% en faveur de l'énantiomère *S*. L'activité catalytique du **CLEC T/Ru** est 7 fois plus importante, avec un rendement de 53%, et un excès énantiomérique similaire (8% en faveur de l'énantiomère *S*) tout en gardant l'intégrité de l'enzyme. Encore plus intéressant, le **CLEC O/Ru** possède une activité légèrement inférieure au **CLEC T/Ru** (44% de rendement) mais avec un excès

énantiomérique bien plus intéressant (31% en faveur de l'énantiomère *R*). Cette étude met en avant certains avantages de l'emploi des CLEC : (i) la résolution de la structure cristallographique, (ii) l'amélioration de l'activité catalytique et (iii) l'amélioration de la sélectivité de la réaction. De plus, il est important de préciser que la forme des cristaux (quadratiques ou orthorhombiques) influence grandement la sélectivité de la réaction.

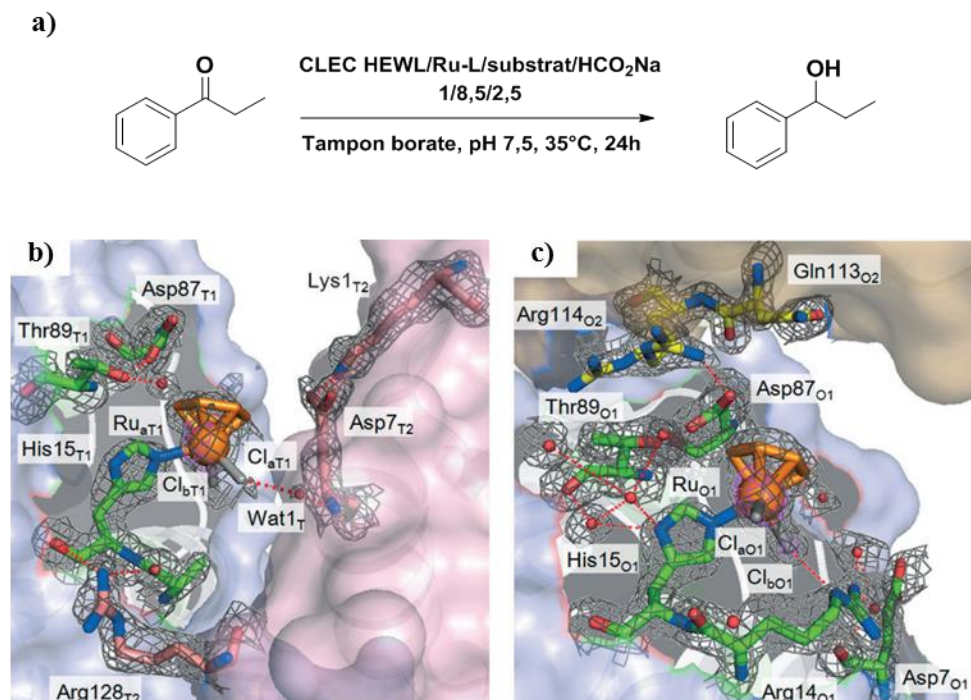


Figure I-54 : a) Conditions réactionnelles de la réaction d'hydrogénation par les CLEC *O/Ru* ou *T/Ru*. b) Structure cristallographique des cristaux quadratiques *T/Ru*. c) Structure cristallographique des cristaux orthorhombiques *O/Ru*.

Bien que l'industrialisation des CLEC soit moins développée que celle des CLEA, il existe certaines applications à l'utilisation des CLEC au niveau industriel. Notamment, la société Altus Biologics, développée en 1997, a mis en vente des cristaux de protéines comme biocatalyseurs industriels pour l'hydrogénation d'alcènes.¹⁶⁰

4-5. Conclusion

L'immobilisation d'enzymes est une méthode prometteuse pour le développement des biocatalyseurs dans l'industrie. Depuis une dizaine d'années, quelques exemples d'enzymes immobilisées ont vu le jour en milieu industriel avec diverses applications (synthèse de médicaments, biocapteurs, encres, peintures, etc...). En effet, l'amélioration de la tolérance

des enzymes vis-à-vis des solvants, de la température ou encore des pH acides ou basiques permet aux industriels de développer de nouvelles méthodologies de synthèses plus éco-compatibles à un coût raisonnable. Les différentes méthodes de réticulation d'enzymes présentent chacune des avantages et des inconvénients répertoriés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des différentes méthodes d'immobilisation d'enzymes.

Méthodes d'immobilisation	Avantages	Inconvénients
Adsorption	<ul style="list-style-type: none"> • Méthode simple et économique • Fixation rapide et non dénaturante • Pas de modifications chimiques sur l'enzyme 	<ul style="list-style-type: none"> • Taux de relargage important • Faible concentration en catalyseur par mg de matériau • Mauvaise orientation de l'enzyme • Structure inconnue
Liaisons covalentes	<ul style="list-style-type: none"> • Taux de relargage très faible • Force de la liaison • Grande variété de supports 	<ul style="list-style-type: none"> • Faible concentration en catalyseur par mg de matériau • Activation du support au préalable • Diminution de l'activité catalytique • Structure inconnue
Encapsulation	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de modifications chimiques de l'enzyme • Activité catalytique similaire à l'enzyme libre • Protège l'enzyme des conditions extérieures 	<ul style="list-style-type: none"> • Relargage de l'enzyme • Difficultés stériques pour les substrats trop volumineux • Faible concentration en catalyseur par mg de matériau • Structure inconnue
Inclusion	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de modifications chimiques de l'enzyme • Activité catalytique similaire à l'enzyme libre • Protège l'enzyme des conditions extérieures 	<ul style="list-style-type: none"> • Conditions d'immobilisation parfois dénaturantes • Difficultés stériques pour les substrats trop volumineux • Relargage de l'enzyme • Faible concentration en catalyseur par mg de matériau • Structure inconnue
Réticulation d'enzymes (CLEA)	<ul style="list-style-type: none"> • Méthode simple et économique • Pas de nécessité d'obtenir une enzyme pure • Très haute concentration en catalyseur par mg de matériau • Pas de perte de l'enzyme 	<ul style="list-style-type: none"> • Possibles modifications de l'enzyme • Mise en place des procédés expérimentaux compliqués • Structure inconnue • Diffusion des substrats et produits difficiles
Réticulation d'enzymes (CLEC)	<ul style="list-style-type: none"> • Très haute concentration en catalyseur par mg de matériau • Intégrité de l'enzyme préservée • Résolution de structure cristallographique • Diffusion des substrats et produits aisée 	<ul style="list-style-type: none"> • Méthode peu économique • Nécessité d'obtenir une enzyme pure • Nécessité d'utiliser une enzyme cristallisable • Consommation importante de cristaux

5. Chimie en cascade

La Nature est une source d'inspiration inépuisable pour les scientifiques du monde entier. Au fil du temps, elle est devenue de plus en plus organisée et complexe, menant au développement de systèmes catalytiques très sophistiqués. Par l'intermédiaire de synthèses multi-étapes, des molécules complexes peuvent être synthétisées à partir d'éléments simples. Pour cela, la Nature utilise différentes enzymes, qui possèdent chacune un rôle très précis dans la cascade de réactions. Cette coopération entre chaque système catalytique mis en jeu maximise l'utilisation de l'énergie et diminue la génération des déchets. Dans le cadre du développement d'une chimie durable, de nombreux scientifiques s'inspirent de ce modèle universel pour développer des synthèses multi-étapes très efficaces, très sélectives et possédant une plus large diversité de réactions catalysées (chimie tandem). Comparés aux synthèses classiques, les procédés monotopes (« one-pot » en anglais) offrent une approche attractive permettant d'éliminer les étapes de purification intermédiaires et donc de limiter les déchets produits et diminuer l'impact environnemental (**Figure I-55**).

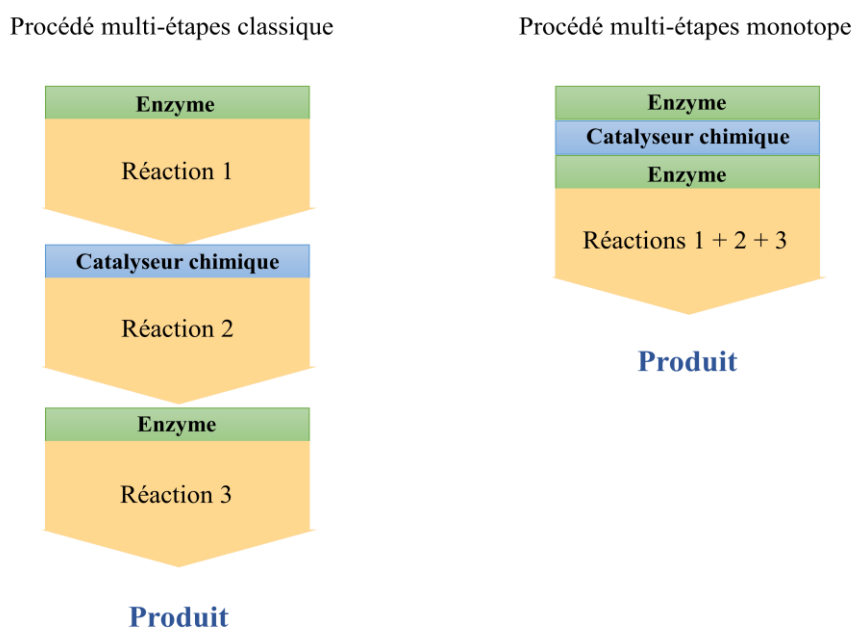


Figure I-55 : Comparaison d'un procédé multi-étapes classique et d'un procédé monotope.

L'approche la plus aisée pour réaliser ces réactions en cascade est de réaliser la première réaction jusqu'à la conversion totale du substrat puis de démarrer la deuxième étape en ajoutant les réactifs nécessaires : les deux étapes sont séparées dans le temps mais sont

réalisées dans le même milieu réactionnel. Une deuxième approche est possible où les deux réactions sont réalisées simultanément avec l'ajout de tous les réactifs dès le début de la réaction. Cette deuxième approche est plus difficile à cause de la possible incompatibilité entre les différents catalyseurs et les différents réactifs mis en jeu. Elle nécessite donc la compartimentation de chaque catalyseur. En revanche, elle permet de ne pas se préoccuper de la réaction jusqu'à son terme.

Ces réactions cascades peuvent être réalisées selon trois schémas :

- En combinant plusieurs catalyseurs chimiques.
- En combinant plusieurs enzymes.
- En combinant une enzyme avec un catalyseur chimique.

5-1. Cascades multi-étapes réalisées par des catalyseurs chimiques

Une des possibilités pour réaliser une réaction cascade est de combiner plusieurs catalyseurs chimiques.¹⁶¹ Cette possibilité offre l'avantage de pouvoir réaliser des synthèses multi-étapes avec une très grande diversité réactionnelle comparées à des cascades enzymatiques. De plus en plus, les molécules recherchées dans les industries gagnent en complexité et il devient donc nécessaire de trouver de nouvelles voies de synthèse efficaces et économiques. Notamment, la production de produits naturels en combinant des catalyseurs chimiques dans une réaction monotope est l'une des nouvelles préoccupations dans l'industrie.¹⁶²

Récemment, le groupe d'Aleman a développé un système photocatalytique pour la synthèse de sulfoxydes à partir d'alcènes et de thiols.¹⁶³ Cette réaction tandem est réalisée en deux étapes : une addition du thiol sur l'alcène suivie d'une oxydation du thioéther formé pour conduire au sulfoxyde en utilisant un photocatalyseur (le colorant Eosin Y), la lumière visible et l'oxygène moléculaire comme oxydant (**Figure I-56**).

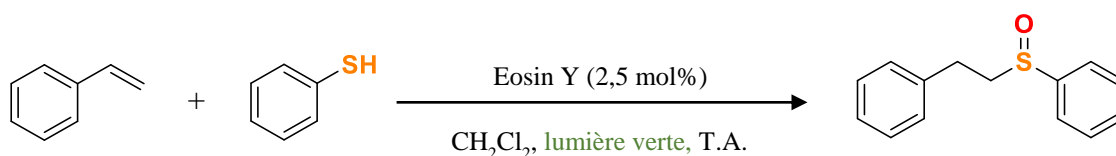


Figure I-56 : Réaction générale d'une réaction tandem pour la synthèse de sulfoxydes.

Cette réaction tandem est réalisable sur une large gamme de substrats avec des rendements intéressants (entre 60 et 85%). En revanche, les temps de réaction sont très longs (plusieurs jours) et aucun excès énantiomérique n'est observé.

Concernant le mécanisme réactionnel, ils ont démontré que la réaction se réalisait en deux étapes distinctes. Une première étape de couplage entre le thiol et l'alcène par voie radicalaire conduisant à un intermédiaire thioéther. Une deuxième étape d'oxydation serait réalisée par l'oxygène singulet. En effet, le photocatalyseur Eosin Y, en présence de lumière serait capable de réaliser un transfert d'énergie permettant de former l'oxygène singulet qui serait capable de réaliser l'oxydation du sulfure en sulfoxyde.

Dans une autre étude, Choudary *et al.* ont créé un système multi-composants inspiré des modèles biologiques pour réaliser une cascade multi-étapes à base de trois catalyseurs chimiques (**Figure I-57**).¹⁶⁴



Figure I-57 : Représentation schématique du cycle catalytique de la synthèse de diols chiraux en combinant trois catalyseurs chimiques.

Ce système est composé d'un complexe de palladium, d'un complexe d'osmium en présence de 1,4-bis(9-*O*-dihydroquinidiny)phthalazine ((DHQD)₂PHAL) en tant qu'auxiliaire chiral et d'un complexe de tungstène. Ces différents catalyseurs sont incorporés sur une matrice comportant un hydroxyde double lamellaire (LDH). Cette matrice consiste en l'alternance de couches cationiques et anioniques qui vont permettre l'ancrage supramoléculaire des différents complexes. Le catalyseur trifonctionnel LDH-PdOsW a été testé dans la réaction tandem combinant un couplage de Heck entre un dérivé du styrène et un dérivé de l'iodobenzène, une oxydation de la *N*-méthylmorpholine (NMM) en *N*-méthylmorpholine-*N*-oxyde (NMO) par H_2O_2 et la dihydroxylation asymétrique de l'alcène formé. A partir d'iodobenzène et du styrène comme substrats, le 1,2-diphényléthane-1,2-diol est formé avec

d'excellents rendements et excès énantiomériques (90% de rendement, 99% *ee* en faveur de l'énantiomère *RR*). D'autres dérivés de l'iodobenzène et du styrène ont été testés atteignant les mêmes résultats catalytiques pour la formation du diol (rendements > 83% et *ee* > 97% en faveur de l'énantiomère *RR*). Les auteurs ont donc développé un catalyseur solide trifonctionnel LDH-PdOsW réutilisable, pour la synthèse de diols chiraux à partir de dérivés de l'iodobenzène, de dérivés du styrène et de H₂O₂ en présence de NMM, qui possède des propriétés catalytiques très intéressantes avec l'obtention d'excellents rendements et d'excellents excès énantiomériques. Cet exemple permet une première ouverture sur le développement de catalyseur hétérogène pour réaliser des réactions cascades. En revanche, il utilise certains progrès doivent encore être réalisés pour s'affranchir de l'utilisation de métaux rares et toxiques.¹⁶⁵

5-2. Cascades multi-étapes réalisées par des enzymes

Une autre alternative proposée est le développement d'une réaction tandem utilisant uniquement des enzymes naturelles.¹⁶⁶⁻¹⁷⁰ Cette solution présente l'avantage de combiner plusieurs enzymes qui catalysent chacune une réaction donnée avec une très grande sélectivité et une très grande efficacité catalytique sans qu'elles n'interfèrent entre elles. En 2016, Li *et al.* ont développé trois nouvelles réactions en cascade pour la production de composés chiraux importants pour l'industrie pharmaceutique tels que des acides α -hydroxylés, des 1,2-aminoalcools ou encore des acides aminés.¹⁷¹ Pour réaliser cette chimie cascade, les auteurs ont créé trois souches d'*Escherichia coli* contenant deux à trois modules d'enzymes qui catalysent chacun de deux à quatre réactions enzymatiques (**Figure I-58**). Ces modules ont été conçus en fonction des deux critères suivants : (i) chaque module utilise un substrat stable (alcène, diol ou acide hydroxylé) et donne un produit stable (diol, acide hydroxylé, aminoalcool et acide aminé) et (ii) chaque module est capable de convertir des intermédiaires toxiques et instables tels que des époxydes, des aldéhydes hydroxylés et des cétoacides pour minimiser leur accumulation et éviter les réactions secondaires. La première réaction tandem *in vivo* est réalisée en combinant les enzymes du module 1 à celles du module 2 pour la formation d'acides α -hydroxylés (**Figure I-58, a**). Dans cette cascade enzymatique, le module 1 (époxydase (EP) + époxyde hydrolase (EH)) est utilisé pour la production de diols énantiopurs à partir d'alcènes et est combiné au module 2 (alcool déshydrogénase (ADH) + aldéhyde déshydrogénase (ALDH)) pour la production d'acides α -hydroxylés à partir des

diols formés précédemment. Pour la majorité des alcènes utilisés, des rendements supérieurs à 80% et des excès énantiomériques supérieurs à 98% en faveur de l'énantiomère *S* sont obtenus.

La deuxième réaction *in vivo* combine le module 1 et le module 3 (ADH + ω -transaminase (ω -TA) + alanine déshydrogénase (AlaDH)) pour la production de 1,2-aminoalcools à partir d'alcènes (**Figure I-58, b**). Le module 3 utilise comme substrat les diols formés par le module 1. Pour cette réaction, les rendements varient entre 16% et 86% en fonction des substituants présents sur l'alcène de départ. Avec des groupements électrodonneurs comme le groupement méthoxyle, les rendements sont largement améliorés. De plus, les excès énantiomériques sont excellents avec une majorité supérieure à 95% en faveur de l'énantiomère *S*.

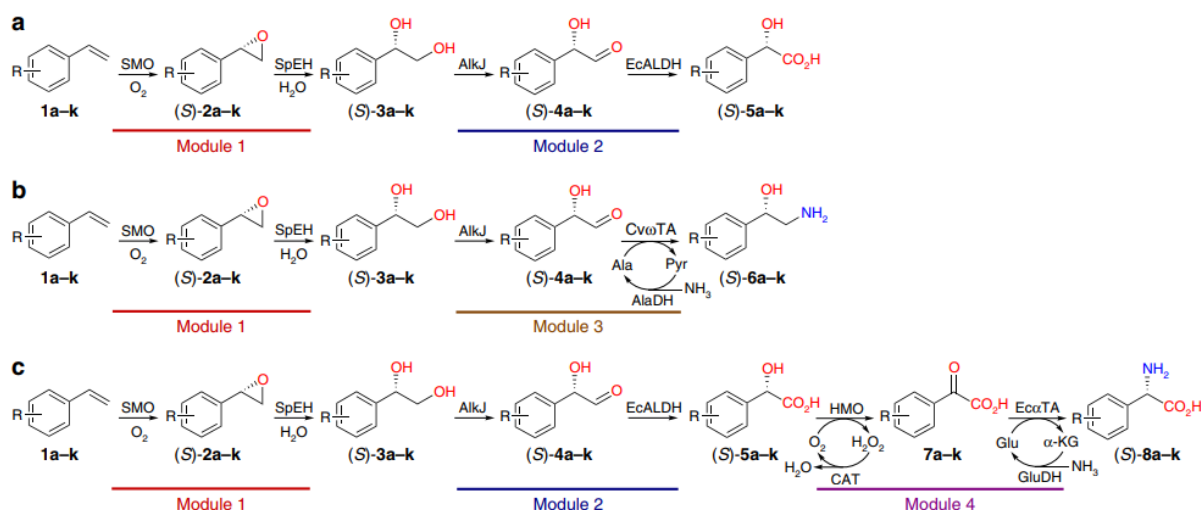


Figure I-58 : cascades *in vivo* pour la production d'acides α -hydroxylés (a), de 1,2-aminoalcools (b) et d'acides aminés (c) à partir de dérivés du styrène.

Pour finir, les modules 1 et 2 sont combinés au module 4 (2-hydroxy-acide oxydase (HO) + α -transaminase (α -TA) + catalase (CAT) + glutamate déshydrogénase (GluDH)) pour la synthèse d'acides aminés (**Figure I-58, c**). Dans cette réaction tandem, l'acide α -hydroxylé, formé à partir de la réaction tandem réalisée par les modules 1 et 2, est le substrat de départ du module 4 pour la formation de l'acide aminé correspondant. Les rendements sont majoritairement supérieurs à 60% avec un maximum atteint en présence du styrène (88%) et d'excellents excès énantiomériques (99% en faveur de l'énantiomère *S*).

Ce modèle montre que la combinaison de plusieurs enzymes pour réaliser des réactions cascades peut être une solution très intéressante dans le développement d'une chimie durable.

En effet, ce système multi-enzymes permet la fonctionnalisation d'alcènes en produits optiquement actifs (amines, alcools, acides, etc...) avec une très grande efficacité, une très grande sélectivité et sans interférence des enzymes entre elles.

Dans une deuxième étude, Turner *et al.* ont décidé de développer une cascade enzymatique pour la synthèse d'aldéhydes.¹⁷² Les aldéhydes sont une classe de composés chimiques avec de nombreuses applications en industrie. Ce sont des composés qui sont en partie responsables des arômes et des parfums présents dans les plantes. Par exemple, les aldéhydes aliphatiques comme l'hexanal et l'octanal offrent des senteurs de pomme et de citron, respectivement, alors que des aldéhydes aromatiques tels que le benzaldéhyde ou la vanilline dégagent un parfum d'amande ou de vanille. Au-delà des applications dans les domaines des arômes et des parfums, les aldéhydes peuvent être utilisés comme précurseurs pour l'industrie pharmaceutique.¹⁷³ En effet, la grande réactivité du groupement carbonyle en fait des candidats très intéressants pour le développement de nombreuses molécules biologiquement actives (alcool, amine, etc...).

Le but de cette étude est de synthétiser des composés de type pipéridine ou pyrrolidine grâce à la mise en place d'une cascade biocatalytique impliquant une acide carboxylique réductase (CAR), une transaminase et un imine réductase (IRED) (**Figure I-59**).¹⁷⁴ A partir de composés cétoacides ou cétoaldéhydes, la CAR permet la formation d'un aldéhyde qui est transformé en imine par l'intermédiaire de la transaminase. L'IRED a ensuite pour rôle de réduire l'imine en amine secondaire afin d'obtenir les composés souhaités. Ces composés sont produits avec de très bons rendements (< 98%) et de très bonnes sélectivités contrôlées par chacune des enzymes utilisées.

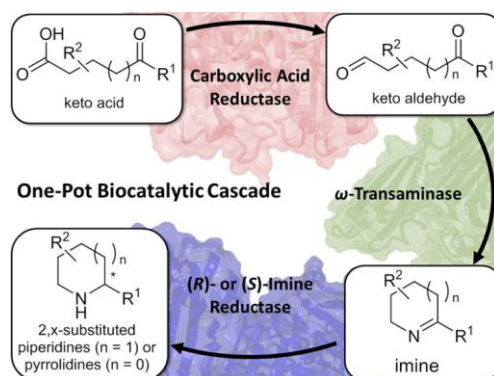


Figure I-59 : Cascade biocatalytique pour la formation de pipéridine ou de pyrrolidine impliquant des aldéhydes.¹⁷⁴

D'autre part, Kroutil *et al.* ont développé une réaction cascade pour la bioamination d'alcools primaires en combinant une ADH et une transaminase.¹⁷⁵ En comparant avec le système de Li, la réaction est largement simplifiée puisqu'elle n'est pas réalisée *in vivo* mais sur des enzymes isolées ce qui simplifie les conditions réactionnelles. En revanche, elle nécessite l'utilisation de co-facteurs. Ce nouveau chemin métabolique artificiel se divise en deux étapes :

- L'oxydation de l'alcool primaire en aldéhyde par l'intermédiaire de l'enzyme ADH en présence d'un co-facteur NAD⁺.
- L'amination réductrice de l'aldéhyde en amine primaire par une transaminase. Pour cette étape, la L-alanine joue le rôle de donneur d'amine qui peut être recyclé *in situ* à partir du pyruvate *via* une AlaDH qui consomme du NaDH et de l'ammoniaque.

Ce système enzymatique artificiel conduit donc à la production d'amines à partir d'alcools primaires avec une très grande efficacité (99% de rendement). L'avantage de ce système métabolique repose sur son autonomie concernant les équivalents rédox (la présence d'une source d'hydrure externe n'est pas nécessaire). Le seul substrat sacrificiel requis est l'ammoniac comme source d'amine. De plus, les déchets sont minimisés en évitant l'utilisation de tampon classique de type Tris ou phosphate puisque la réaction est réalisée dans un mélange H₂O/diméthoxyéthane.

5-3. Cascades multi-étapes en combinant les catalyses enzymatiques et homogènes

La combinaison des deux mondes de la biocatalyse et de la catalyse chimique conduit à des procédés monotopes très efficaces, très sélectifs et avec une plus grande diversité de réactions que dans le cas de systèmes biocatalytiques.^{176, 177} La difficulté de cette combinaison est la nécessité de trouver des conditions réactionnelles où les enzymes et les catalyseurs chimiques puissent coexister (solvants, températures, pH, pressions, etc...).

Les premiers travaux révolutionnaires dans ce domaine ont été décrits dans les années 1980, lorsque le groupe de Van Bekkum a combiné un catalyseur chimique hétérogène d'hydrogénation avec une enzyme isomérase (**Figure I-60**).¹⁷⁸ Ce procédé a été développé pour la synthèse du D-mannitol à partir du D-glucose. Dans cette réaction tandem, le D-

glucose est transformé en D-fructose grâce à l'isomérase puis le D-mannitol ou le D-glucitol sont obtenus par hydrogénation du D-fructose, catalysée par un complexe de platine en présence d'H₂ (20 atm). Lors de cette catalyse, les deux produits réactionnels sont obtenus avec un rendement global de 92% (18 TON) et dans un ratio 1:1. En revanche, la cinétique de la réaction est très lente avec l'obtention d'un TOF très faible (0,0009 min⁻¹).

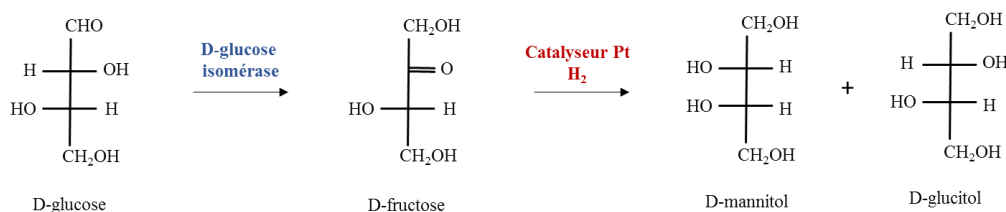


Figure I-60 : Combinaison de la D-glucose isomérase et d'un catalyseur chimique hétérogène à base de platine pour la formation du D-mannitol à partir du D-glucose.¹⁷⁸

Récemment, Hartwig *et al.* ont reporté la combinaison d'un catalyseur chimique à base de ruthénium et du Cyt. P450 permettant de combiner une réaction de métathèse avec une époxydation d'alcènes sur un nombre de substrats variés(**Figure I-61**).¹⁷⁹ Elle illustre le bénéfice de combiner ces deux catalyseurs en réaction tandem plutôt qu'avec deux réactions séquentielles où il est nécessaire d'isoler et parfois de purifier les intermédiaires réactionnels. En effet, lors de la réaction tandem, l'époxyde est obtenu avec un rendement de 27% alors qu'avec le procédé classique, 18% d'époxyde seulement sont obtenus. Le procédé monotope permet donc d'améliorer la sélectivité et l'efficacité de la réaction d'un facteur 1,5.

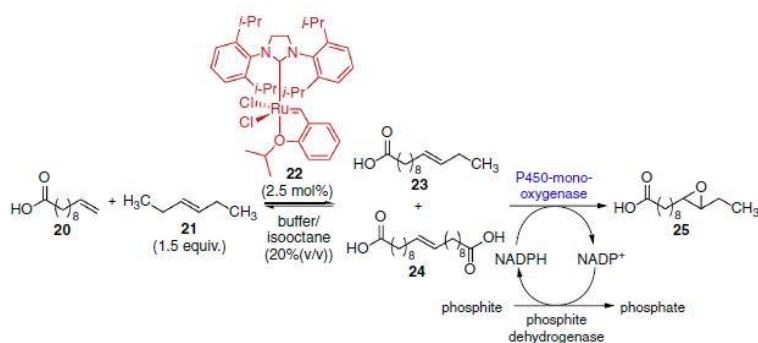


Figure I-61 : Réaction tandem combinant une réaction de métathèse et une époxydation d'alcènes.¹⁷⁹

D'après les exemples précédents, les catalyses enzymatiques et chimiques offrent une complémentarité très intéressante pour le développement de nouveaux procédés. En revanche,

les réactions en cascade combinant un complexe chimique et une enzyme sont difficiles à réaliser. En effet, dans de nombreux cas, ces deux catalyseurs s'inactivent mutuellement donnant des rendements et des sélectivités très faibles. Pour surmonter ces limitations, Ward *et al.* ont incorporé un complexe organométallique à base d'iridium au sein de la streptavidine menant à la formation d'une nouvelle hydrogénase artificielle (ATHase) permettant d'éviter cette inactivation mutuelle (**Figure I-62**).¹⁸⁰

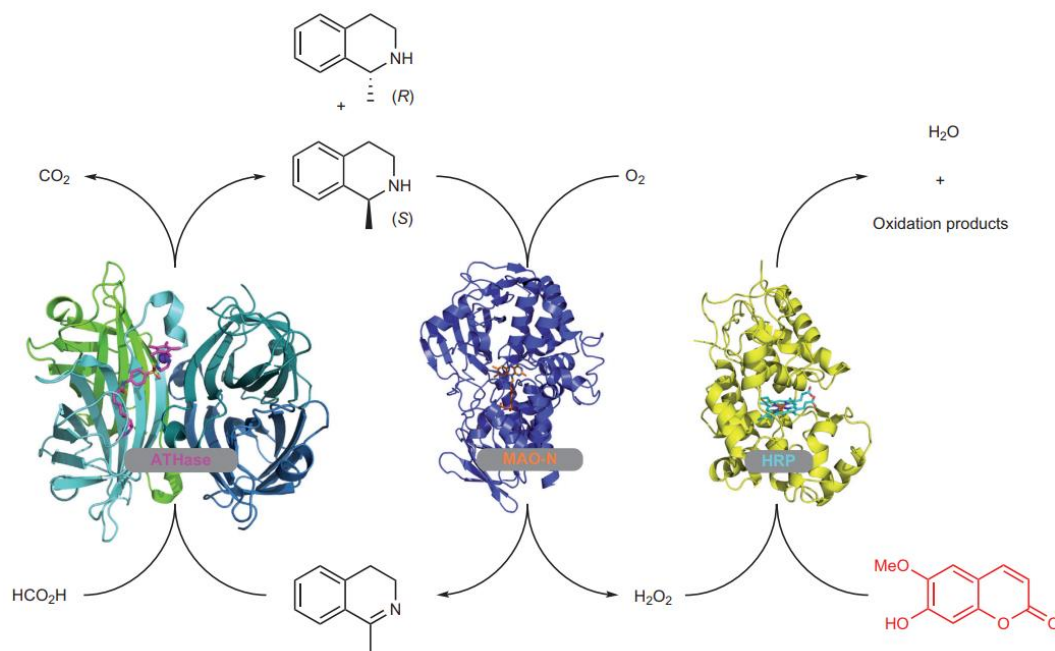


Figure I-62 : Représentation de la réaction tandem.¹⁸⁰

La cascade réactionnelle est composée de trois enzymes : une hydrogénase artificielle (ATHase), une monoamine oxydase (MAO-N) et une catalase (HRP : peroxydase du raifort). Chaque enzyme possède un rôle bien précis : ATHase permet la réduction du substrat imine en amine par l'intermédiaire du formiate de sodium. Cette réaction conduit à la formation d'un mélange de deux énantiomères du produit amine. Ensuite, la MAO-N catalyse sélectivement l'oxydation de l'énantiomère *S* précédemment formé en présence d'O₂ afin d'accumuler l'énantiomère *R* au fil des cycles catalytiques. Cette réaction entraîne la formation d'H₂O₂, qui réagit avec un colorant (scopolétine) en présence de la catalase permettant d'observer l'avancement de la réaction en suivant la décoloration de la solution. La présence de la catalase est primordiale pour éviter l'inhibition de l'ATHase par H₂O₂ qui, sinon, devrait être ajouté massivement en début de réaction. En présence de ces trois enzymes,

d'excellents rendements et d'excellents excès énantiomériques sont obtenus (99% de rendement et 99% *ee* en faveur de l'énantiomère *R*).

5-4. Conclusion

Dans le cadre d'une chimie durable, le développement d'une chimie tandem inspirée du métabolisme des êtres vivants représente une nouvelle voie intéressante à développer bien que celle-ci reste encore compliquée à réaliser. En effet, cela peut permettre la réduction des déchets chimiques en évitant les étapes d'isolation et de purification des intermédiaires réactionnels ou encore la réduction des coûts et des temps de production. La première stratégie employée pour développer des réactions en cascade est la combinaison d'enzymes naturelles possédant des propriétés d'efficacité et de sélectivité inégalées. En revanche, cette stratégie est restreinte en termes de diversité réactionnelle. Une deuxième solution est la combinaison de catalyseurs chimiques. Contrairement aux cascades enzymatiques, cette stratégie possède une très grande diversité réactionnelle due à l'utilisation illimitée de catalyseurs chimiques. En revanche, les performances catalytiques des catalyseurs chimiques ne sont pas encore comparables à celles des enzymes. Une stratégie alternative consiste à combiner les enzymes et les catalyseurs chimiques pour développer une chimie tandem à la fois efficace, sélective et possédant une grande diversité réactionnelle. Cependant, il existe encore quelques limitations au développement de ce type de stratégie comme l'inhibition des enzymes par les catalyseurs chimiques ou encore l'incompatibilité des conditions réactionnelles (pH, solvant, température, etc...).

6. Description de mon projet de thèse

Depuis de nombreuses années, l'équipe BioCE du LCBM s'efforce de développer de nouveaux catalyseurs hybrides capables de réaliser des réactions d'oxydation plus respectueuses de l'environnement. Leur stratégie est de combiner un catalyseur bio-inspiré, choisi pour la réactivité souhaitée, avec une protéine dont l'échafaudage est chiral.

Le choix du complexe inorganique et de la protéine est crucial pour ce projet ; en effet, ce complexe métallique doit être capable d'activer des oxydants doux tels qu' O_2 ou H_2O_2 . De plus, le contrôle de la réaction doit être assurée afin d'insérer un ou deux atomes d'oxygène sélectivement et efficacement au sein de substrats exogènes. Pour finir, le ligand doit posséder un motif de reconnaissance permettant l'ancrage de ce dernier au sein de la protéine. Quant à la protéine, elle doit nécessairement posséder une cavité capable d'accueillir le complexe inorganique ainsi que les différents réactifs.

Dans mon projet de thèse, nous avons choisi de travailler avec la protéine bactérienne NikA. NikA est une protéine de 56 kDa impliquée dans le transport du nickel chez *Escherichia Coli*. D'après plusieurs études menées, Fontecilla-Camps *et al.* ont démontré que la protéine NikA était capable à la fois de fixer des complexes métalliques physiologiques ($Ni(His)_2$) et non physiologiques ($Fe(III)-EDTA$). En effet, en 2005, une étude structurale a permis l'identification du site de fixation de la protéine, ainsi que le mode de liaison du $Fe(III)-EDTA$ au sein de la cavité. (Figure I-63).¹⁸¹

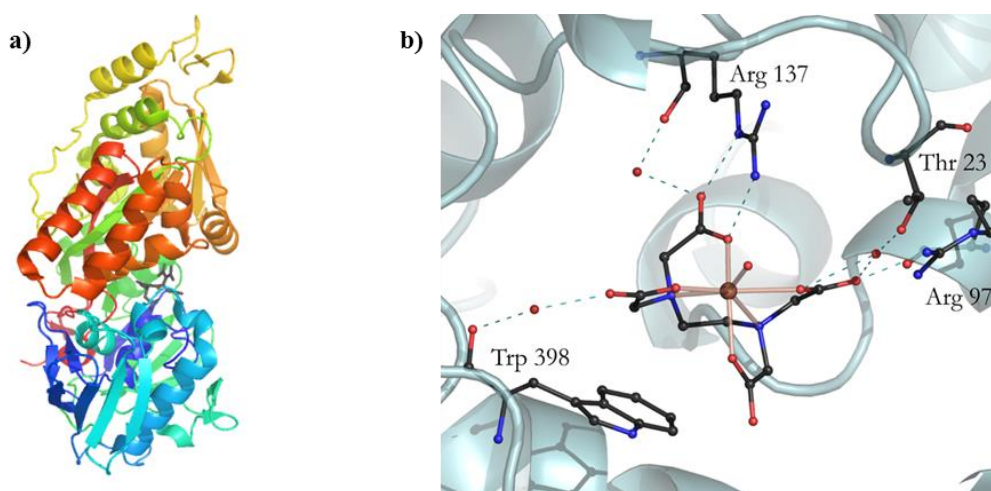


Figure I-63 : a) Structure de la protéine NikA. b) Structure cristallographique de NikA/ $Fe-EDTA$.

Les données cristallographiques montrent que la protéine NikA cristallise dans le groupe d'espace $P2_12_12_1$ et que deux molécules A et B sont présentes par unité asymétrique. Le complexe est maintenu au sein de la protéine par l'intermédiaire de liaisons supramoléculaires. La plus forte d'entre elles est la formation d'un pont salin entre l'arginine 137 de la protéine et un groupement carboxylate du ligand. D'autres interactions ont été mises en évidence, bien que plus faibles, comme des liaisons hydrogène avec l'arginine 97, la thréonine 23, le tryptophane 398 et la tyrosine 402, via une molécule d'eau. Les données cristallographiques permettent de mettre en avant l'importance du groupement carboxylate dans la fixation du complexe au sein de la protéine NikA. Les connaissances acquises au niveau de la structure de la protéine permettent d'identifier facilement le type de complexe qui pourrait être inséré dans cette protéine et en font donc une candidate intéressante pour le développement de nouvelles métalloenzymes artificielles. Pour cela, de nouveaux ligands semblables au ligand EDTA et qui possèdent au moins un groupement carboxylate ont donc été synthétisés afin de développer de nouvelles réactivités en oxydation (**Figure I-64**).

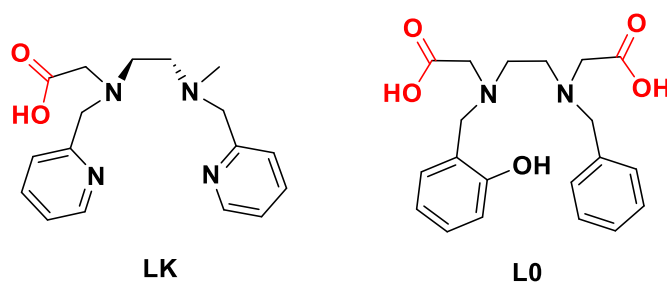


Figure I-64 : Ligands synthétisés pour le développement de métalloenzymes artificielles.

Une première étude sur l'hybride **NikA/Fe-LK** montre deux rôles fondamentaux de l'échafaudage protéique : l'activation du complexe et la reconnaissance du substrat. L'hybride **NikA/Fe-LK** a été développé pour catalyser la sulfoxydation de thioéther en présence de NaOCl (voir paragraphe 3-3-1-4). Pour la reconnaissance du substrat, des calculs d'accostages moléculaires (docking) ont été effectués à partir des différentes structures cristallographiques de l'hybride et d'une base de données (Zinc).¹⁸²

Une deuxième étude a été réalisée au laboratoire en 2010 par Cavazza *et al.* sur l'hybride **NikA/Fe-L0**.¹¹⁴ Le but de cette étude était de déchiffrer le mécanisme réactionnel d'activation d'O₂ par cristallographie en temps résolu. (**Figure I-65**).

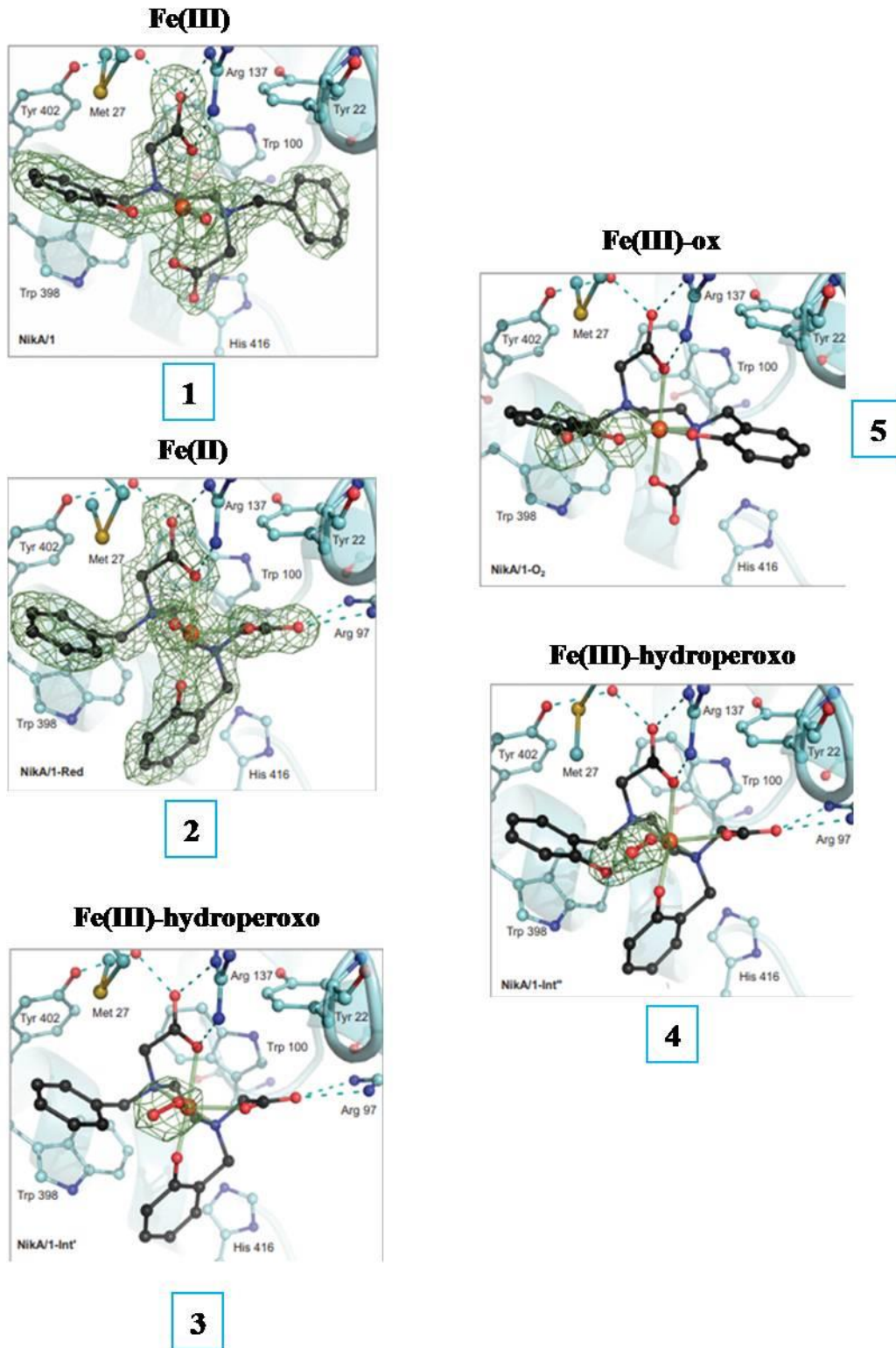


Figure I-65 : Structures cristallographiques des différents intermédiaires réactionnels de l'hybride *NikA/Fe-L0* en présence de DTT/O₂.

Dans un premier temps, lorsque le cristal rouge (dû à la couleur du complexe) de **NikA/Fe(III)-L0** (1) est mis en présence d'un réducteur, le dithiothréitol (DTT), en boîte à

gants, celui-ci se décolore complètement. Ce changement de couleur atteste de la réduction du Fe(III) en Fe(II)(**2**). A cette étape, le complexe est totalement réorganisé, par compensation de charge. En effet, les différents ligands se positionnent différemment par rapport à l'état initial : (i) le ligand carboxylate prend la place du ligand benzyle et va ainsi interagir avec l'arginine 97 (ii) le ligand phénol prend la place du ligand carboxylate et (iii) le ligand phénol prend la place du ligand benzyle. Ce dernier remplacement positionne le ligand benzyle proche de l'ion ferrique. Ensuite, l'intermédiaire **2**, étant à l'état d'oxydation +II est capable d'activer O₂ générant alors une espèce active de type Fe(III)-peroxo (**3**). Cet intermédiaire n'étant pas assez oxydant pour réaliser l'hydroxylation aromatique, l'étape suivante serait probablement une coupure homolytique ou hétérolytique conduisant à des espèces à haut degré d'oxydation capables de réaliser l'hydroxylation aromatique intramoléculaire en position α . Une fois la première hydroxylation réalisée, une deuxième molécule d'O₂ serait activée amenant à l'intermédiaire **4** qui subirait aussi une coupure de la liaison O-O menant à une espèce très oxydante capable de réaliser la deuxième hydroxylation aromatique pour former l'espèce oxydée **5**. En revanche, la formation du catéchol entraîne une saturation de la sphère de coordination de l'hybride **NikA/Fe-L0** ce qui inhibe son activité (limitée à 2 TON).

Ces deux études montrent l'intérêt d'utiliser des métalloenzymes artificielles pour réaliser des réactions d'oxydation diverses. En revanche, l'utilisation de biocatalyseurs artificiels de ce type amènent quelques inconvénients : (i) le manque de stabilité dû à l'utilisation d'oxydants forts (NaOCl), (ii) la faible solubilité des substrats en milieu aqueux ou (iii) le nombre de TON limité (2 TON pour l'hybride **NikA/Fe-L0**). Pour améliorer le nombre de TON du catalyseur, différents ligands seront synthétisés en bloquant les positions oxydables. Concernant le manque de stabilité des métalloenzymes artificielles et la faible solubilité des substrats, la stratégie envisagée est de développer des biocatalyseurs hétérogènes (**Figure I-66**). Pour cela, des cristaux de métalloenzymes artificielles (système hétérogène) seront conçues en variant les complexes ancrés à l'intérieur. Ces cristaux seront ensuite stabilisés par l'intermédiaire de la technologie CLEC nous permettant d'obtenir des objets catalytiques plus stables vis-à-vis du solvant et de l'oxydant utilisés, de la température ou encore du pH de la réaction. Les métalloenzymes artificielles hétérogènes obtenues pourront ensuite être utilisées dans différentes réactions d'oxydation.

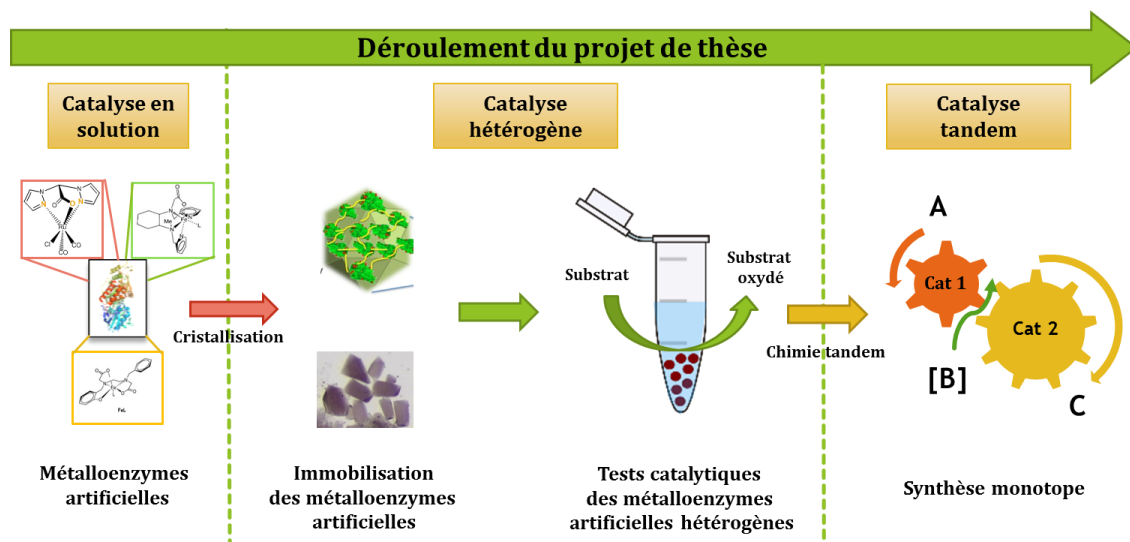


Figure I-66 : Illustration de mon projet de thèse.

Pour aller encore plus loin, les nouveaux biocatalyseurs hétérogènes développés pourront être combinés afin de développer une réaction en cascade.

Pour résumer, mon projet de thèse s'inscrit dans le développement d'une chimie durable en accord avec de nombreux principes de la chimie verte. Notre stratégie est basée sur la conception de cristaux de métalloenzymes artificielles réticulés utilisés comme catalyseurs hétérogènes dans diverses réactions d'oxydation. Ces nouveaux catalyseurs permettent de combiner les avantages des différents modes de catalyse : enzymatique, homogène et hétérogène.

Trois objectifs ont été fixés pour mon projet de thèse :

- 1-la conception de deux nouvelles métalloenzymes artificielles,
- 2-le développement de métalloenzymes artificielles hétérogènes,
- 3- l'évolution de ces précédents objets catalytiques dans le cadre d'une chimie tandem.

1- La première métalloenzyme artificielle avait pour but d'insérer un complexe de cuivre au sein d'une protéine pour catalyser l'oxydation de l'alcool benzylique en benzaldéhyde en activant O_2 . Pour cela, une collaboration avec V. Blandin *et al.* de l'équipe Synthèse et Réactivité en Chimie Organique (SeRCO) du Département de Chimie Moléculaire de Grenoble a été mise en place (**Chapitre II, 1^{ère} partie**) Le deuxième hybride avait pour objectif d'activer un complexe inactif en milieu aqueux et de lui conférer une réactivité non naturelle, l'hydroxychloration d'alcènes en présence de diacétate d'iodobenzène (PIDA). Dans cette étude, un complexe de ruthénium développé par Burzlaff *et al.* sera ancré au sein de la protéine NikA (**Chapitre II, 2^{ème} partie**).¹⁸³

2- Le deuxième objectif majeur de ce projet était de développer une biocatalyse hétérogène. La version hétérogène des métalloenzymes artificielles à base de la protéine NikAa été développée *in crystallo*. La stabilisation nécessaire des cristaux a été réalisée par l'intermédiaire d'une technique d'immobilisation d'enzymes : la technologie CLEC. Après le développement et la caractérisation de ces nouveaux objets catalytiques, trois réactivités ont été développées avec ces métalloenzymes artificielles hétérogènes : l'hydroxychloration d'alcènes à l'aide d'Oxone® et de chlore, la coupure oxydante d'alcènes par activation d'O₂ et la sulfoxydation de composés thioéthers avec NaOCl (**Chapitre III**).

Le dernier objectif était la mise en place d'une chimie tandem en testant différentes combinaisons de catalyseurs : (i) en combinant différents complexes en solution ou (ii) en combinant un système CLEC avec un complexe en solution. Pour cela, différentes réactivités développées au laboratoire ont été combinées (**Chapitre IV**) :

- la coupure oxydante d'alcènes soufrés suivie de la sulfoxydation du thioéther pour la production des composés bifonctionnels de type sulfoxyde-aldéhyde,
- le couplage thiol/alcène suivi de la sulfoxydation du thioéther pour donner des composés bifonctionnels de type alcène-sulfoxyde.

Références

1. P. Anastas and N. Eghbali, *Chemical Society Reviews*, 2010, **39**, 301-312.
2. M. A. Murphy, *Foundations of Chemistry*, 2018, **20**, 121-165.
3. K. P. Bryliakov, *Chemical Reviews*, 2017, **117**, 11406-11459.
4. Y. Liang, J. Wei, X. Qiu and N. Jiao, *Chemical Reviews*, 2018, DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00193.

5. R. N. Patel, *Coordination Chemistry Reviews*, 2008, **252**, 659-701.
6. B. Bhushan, *Philos. Trans. R. Soc. A: Math. Physical and Eng. Sci.*, 2009, **367**, 1445-1486.
7. U. G. K. Wegst, H. Bai, E. Saiz, A. P. Tomsia and R. O. Ritchie, *Nature Materials*, 2014, **14**, 23.
8. G. M. Whitesides, *Interface Focus*, 2015, **5**.
9. H. S. Mason, W. L. Fowlks and E. Peterson, *Journal of the American Chemical Society*, 1955, **77**, 2914-2915.
10. O. Hayaishi, M. Katagiri and S. Rothberg, *Journal of the American Chemical Society*, 1955, **77**, 5450-5451.
11. C. Esmieu, M. V. Cherrier, P. Amara, E. Girgenti, C. Marchi-Delapierre, F. Oddon, M. Iannello, A. Jorge-Robin, C. Cavazza and S. Ménage, *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, **52**, 3922-3925.
12. R. A. Sheldon and S. van Pelt, *Chemical Society Reviews*, 2013, **42**, 6223-6235.
13. N. J. Turner, *Chemical Reviews*, 2011, **111**, 4073-4087.
14. P. R. Ortiz de Montellano, *Chemical Reviews*, 2010, **110**, 932-948.
15. L. Que Jr and W. B. Tolman, *Nature*, 2008, **455**, 333.
16. I. G. Denisov, T. M. Makris, S. G. Sligar and I. Schlichting, *Chemical Reviews*, 2005, **105**, 2253-2278.
17. F. P. Guengerich, *Current Drug Metabolism*, 2001, **2**, 93-115.
18. E. T. Farinas, M. Alcalde and F. Arnold, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 525-528.
19. P. R. Ortiz de Montellano and J. J. De Voss, *Natural Product Reports*, 2002, **19**, 477-493.
20. I. Schlichting, J. Berendzen, K. Chu, A. M. Stock, S. A. Maves, D. E. Benson, R. M. Sweet, D. Ringe, G. A. Petsko and S. G. Sligar, *Science*, 2000, **287**, 1615-1622.
21. S. G. Sligar, *Biochemistry*, 1976, **15**, 5399-5406.
22. M. Katagiri, B. N. Ganguli and I. C. Gunsalus, *Journal of Biological Chemistry*, 1968, **243**, 3543-3546.
23. H. E. Conrad, K. Lieb and I. C. Gunsalus, *Journal of Biological Chemistry*, 1965, **240**, 4029-4037.
24. J. Rittle and M. T. Green, *Science*, 2010, **330**, 933-937.
25. J. T. Groves, *Journal of Chemical Education*, 1985, **62**, 928.
26. P. Nordlund, B.-M. Sjöberg and H. Eklund, *Nature*, 1990, **345**, 593.
27. B. J. Wallar and J. D. Lipscomb, *Chemical Reviews*, 1996, **96**, 2625-2658.
28. J. W. Foster and R. H. Davis, *Journal of Bacteriology*, 1966, **91**, 1924-1931.
29. M. Merckx, D. A. Kopp, M. H. Sazinsky, J. L. Blazyk, J. Müller and S. J. Lippard, *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, **40**, 2782-2807.
30. R. L. Lieberman and A. C. Rosenzweig, *Nature*, 2005, **434**, 177.
31. M. P. Woodland, D. S. Patil, R. Cammack and H. Dalton, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1986, **873**, 237-242.
32. J. Lund, M. P. Woodland and H. Dalton, *European Journal of Biochemistry*, 1985, **147**, 297-305.
33. K. E. Liu, A. M. Valentine, D. Qiu, D. E. Edmondson, E. H. Appelman, T. G. Spiro and S. J. Lippard, *Journal of the American Chemical Society*, 1995, **117**, 4997-4998.
34. S. K. Lee, J. C. Nesheim and J. D. Lipscomb, *Journal of Biological Chemistry*, 1993, **268**, 21569-21577.
35. J. Colby, D. I. Stirling and H. Dalton, *Biochemical Journal*, 1977, **165**, 395-402.

36. L. Que and R. Y. N. Ho, *Chemical Reviews*, 1996, **96**, 2607-2624.
37. K. Valegård, A. C. T. van Scheltinga, M. D. Lloyd, T. Hara, S. Ramaswamy, A. Perrakis, A. Thompson, H.-J. Lee, J. E. Baldwin, C. J. Schofield, J. Hajdu and I. Andersson, *Nature*, 1998, **394**, 805.
38. N. I. Burzlaff, P. J. Rutledge, I. J. Clifton, C. M. H. Hensgens, M. Pickford, R. M. Adlington, P. L. Roach and J. E. Baldwin, *Nature*, 1999, **401**, 721.
39. E. L. Hegg and L. Q. Jr, *European Journal of Biochemistry*, 1997, **250**, 625-629.
40. S. Han, L. D. Eltis, K. N. Timmis, S. W. Muchmore and J. T. Bolin, *Science*, 1995, **270**, 976-980.
41. B. Kauppi, K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund and S. Ramaswamy, *Structure*, **6**, 571-586.
42. T. D. H. Bugg, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 7075-7101.
43. Z. Zhang, J. Ren, D. K. Stammers, J. E. Baldwin, K. Harlos and C. J. Schofield, *Nature Structural Biology*, 2000, **7**, 127.
44. E. Eichhorn, J. R. van der Ploeg, M. A. Kertesz and T. Leisinger, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**, 23031-23036.
45. T. D. H. Bugg and S. Ramaswamy, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2008, **12**, 134-140.
46. J. D. Lipscomb, *Current Opinion in Structural Biology*, 2008, **18**, 644-649.
47. E. G. Kovaleva and J. D. Lipscomb, *Nature Chemical Biology*, 2008, **4**, 186.
48. G. J. Christian, S. Ye and F. Neese, *Chemical Science*, 2012, **3**, 1600-1611.
49. A. J. Fielding, J. D. Lipscomb and L. Que, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2014, **19**, 491-504.
50. L. P. Wackett, *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, **31**, 577-587.
51. S. M. Barry and G. L. Challis, *ACS Catalysis*, 2013, **3**, 2362-2370.
52. S. Resnick, K. Lee and D. Gibson, *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, **17**, 438-457.
53. B. Kauppi, K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund and S. Ramaswamy, *Structure*, 1998, **6**, 571-586.
54. B. E. Haigler and D. T. Gibson, *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**, 457-464.
55. B. E. Haigler and D. T. Gibson, *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**, 465-468.
56. W. C. Suen and D. T. Gibson, *Journal of Bacteriology*, 1993, **175**, 5877-5881.
57. M. D. Wolfe, J. V. Parales, D. T. Gibson and J. D. Lipscomb, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**, 1945-1953.
58. A. Karlsson, J. V. Parales, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund and S. Ramaswamy, *Science*, 2003, **299**, 1039-1042.
59. M. D. Wolfe and J. D. Lipscomb, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 829-835.
60. J. K. Capyk, I. D'Angelo, N. C. Strynadka and L. D. Eltis, *Journal of Biological Chemistry*, 2009, **284**, 9937-9946.
61. S. Chakrabarty, R. N. Austin, D. Deng, J. T. Groves and J. D. Lipscomb, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**, 3514-3515.
62. L. V. Liu, S. Hong, J. Cho, W. Nam and E. I. Solomon, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**, 3286-3299.
63. E. I. Solomon, D. E. Heppner, E. M. Johnston, J. W. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, M. T. Kieber-Emmons, C. H. Kjaergaard, R. G. Hadt and L. Tian, *Chemical Reviews*, 2014, **114**, 3659-3853.
64. D. A. Quist, D. E. Diaz, J. J. Liu and K. D. Karlin, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2017, **22**, 253-288.
65. T. J. Simmons, K. E. H. Frandsen, L. Ciano, T. Tryfona, N. Lenfant, J. C. Poulsen, L. F. L. Wilson, T. Tandrup, M. Tovborg, K. Schnorr, K. S. Johansen, B. Henrissat, P. H. Walton, L. Lo Leggio and P. Dupree, *Nature Communications*, 2017, **8**, 1064.
66. G. R. Hemsworth, E. M. Johnston, G. J. Davies and P. H. Walton, *Trends in Biotechnology*, 2015, **33**, 747-761.
67. C. H. Kjaergaard, M. F. Qayyum, S. D. Wong, F. Xu, G. R. Hemsworth, D. J. Walton, N. A. Young, G. J. Davies, P. H. Walton, K. S. Johansen, K. O. Hodgson, B. Hedman and E. I. Solomon, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, **111**, 8797-8802.

68. K. Parikka, E. Master and M. Tenkanen, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, **120**, 47-59.
69. J. W. Whittaker, *Chemical Reviews*, 2003, **103**, 2347-2364.
70. E. E. Szabó, N. Adányi and M. Váradi, *Biosensors and Bioelectronics*, 1996, **11**, 1051-1058.
71. K. S. Mikkonen, K. Parikka, J.-P. Suuronen, A. Ghafar, R. Serimaa and M. Tenkanen, *RSC Advances*, 2014, **4**, 11884-11892.
72. S. E. Allen, R. R. Walvoord, R. Padilla-Salinas and M. C. Kozlowski, *Chemical Reviews*, 2013, **113**, 6234-6458.
73. W. Nam, *Accounts of Chemical Research*, 2007, **40**, 465-465.
74. W. Nam, *Accounts of Chemical Research*, 2007, **40**, 522-531.
75. K. P. Bryliakov and E. P. Talsi, *Coordination Chemistry Reviews*, 2014, **276**, 73-96.
76. M. C. Feiters, A. E. Rowan and R. J. M. Nolte, *Chemical Society Reviews*, 2000, **29**, 375-384.
77. T. J. Collins and A. D. Ryabov, *Chemical Reviews*, 2017, **117**, 9140-9162.
78. M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen and L. Que, *Chemical Reviews*, 2004, **104**, 939-986.
79. S. V. Kryatov, E. V. Rybak-Akimova and S. Schindler, *Chemical Reviews*, 2005, **105**, 2175-2226.
80. T. Aurore, E. Jason, M. Marlène, Y. V. G., F. J. R., G. Régis, G. Jean-Jacques, M. Eckard, Q. Lawrence and B. Frédéric, *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, **47**, 7064-7067.
81. M. Martinho, Université Paris Sud 11 (Orsay), 2006.
82. K. K. Singh and S. Sen Gupta, *Chemical Communications*, 2017, **53**, 5914-5917.
83. M. E. Auldridge, D. R. McCarty and H. J. Klee, *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, **9**, 315-321.
84. A. Dhakshinamoorthy and K. Pitchumani, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 9911-9918.
85. A. D. Chowdhury, R. Ray and G. K. Lahiri, *Chemical Communications*, 2012, **48**, 5497-5499.
86. S. Peter, Y. Vital, B. P. C. A., W. B. M. and K. G. R. J. M., *Chemistry – A European Journal*, 2013, **19**, 15012-15018.
87. A. Gonzalez-de-Castro and J. Xiao, *Journal of the American Chemical Society*, 2015, **137**, 8206-8218.
88. D. H. R. Barton, A. E. Martell and D. T. Sawyer, *The Activation of Dioxygen and Homogeneous Catalytic Oxidation*, Springer US, 2012.
89. C. Kui and J. L. Que, *Angewandte Chemie International Edition*, 1999, **38**, 2227-2229.
90. M. Costas, A. K. Tipton, K. Chen, D.-H. Jo and L. Que, *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**, 6722-6723.
91. T. Katsuki and V. S. Martin, *Org. React.*, 1996, **48**, 1.
92. O. Cussó, I. Garcia-Bosch, X. Ribas, J. Lloret-Fillol and M. Costas, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**, 14871-14878.
93. M. C. White, A. G. Doyle and E. N. Jacobsen, *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**, 7194-7195.
94. R. Mas-Ballesté and L. Que, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**, 15964-15972.
95. K. Yamamura and E. T. Kaiser, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1976, DOI: 10.1039/C39760000830, 830-831.
96. M. E. Wilson and G. M. Whitesides, *Journal of the American Chemical Society*, 1978, **100**, 306-307.
97. F. Schwizer, Y. Okamoto, T. Heinisch, Y. Gu, M. M. Pellizzoni, V. Lebrun, R. Reuter, V. Köhler, J. C. Lewis and T. R. Ward, *Chemical Reviews*, 2018, **118**, 142-231.
98. M. L. Zastrow, A. F. A. Peacock, J. A. Stuckey and V. L. Pecoraro, *Nature Chemistry*, 2011, **4**, 118.
99. A. Rioz-Martínez and G. Roelfes, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, **25**, 80-87.
100. A. J. Boersma, B. L. Feringa and G. Roelfes, *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, **48**, 3346-3348.
101. G. Roelfes and B. L. Feringa, *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, **44**, 3230-3232.
102. G. Roelfes, M. E. Branum, L. Wang, L. Que and B. L. Feringa, *Journal of the American Chemical Society*, 2000, **122**, 11517-11518.
103. N. Stephanopoulos and M. B. Francis, *Nature Chemical Biology*, 2011, **7**, 876.

104. C. A. Kruithof, H. P. Dijkstra, M. Lutz, A. L. Spek, M. R. Egmond, R. J. M. K. Gebbink and G. v. Koten, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2008, **2008**, 4425-4432.
105. H. Yang, P. Srivastava, C. Zhang and J. C. Lewis, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 223-227.
106. R. R. Davies and M. D. Distefano, *Journal of the American Chemical Society*, 1997, **119**, 11643-11652.
107. J. R. Carey, S. K. Ma, T. D. Pfister, D. K. Garner, H. K. Kim, J. A. Abramite, Z. Wang, Z. Guo and Y. Lu, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 10812-10813.
108. Y. Yu, C. Hu, L. Xia and J. Wang, *ACS Catalysis*, 2018, **8**, 1851-1863.
109. M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii and Y. Watanabe, *Angewandte Chemie International Edition*, 2003, **42**, 1005-1008.
110. Q. Jing and R. J. Kazlauskas, *ChemCatChem*, 2010, **2**, 953-957.
111. H. M. Key, P. Dydio, D. S. Clark and J. F. Hartwig, *Nature*, 2016, **534**, 534.
112. T. Heinisch and T. R. Ward, *Accounts of Chemical Research*, 2016, **49**, 1711-1721.
113. J. Collot, J. Gradinaru, N. Humbert, M. Skander, A. Zocchi and T. R. Ward, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125**, 9030-9031.
114. C. Cavazza, C. Bochot, P. Rousselot-Pailley, P. Carpentier, M. V. Cherrier, L. Martin, C. Marchi-Delapierre, J. C. Fontecilla-Camps and S. Ménage, *Nat Chem*, 2010, **2**, 1069-1076.
115. I. Fernández and N. Khair, *Chemical Reviews*, 2003, **103**, 3651-3706.
116. E. Wojaczyńska and J. Wojaczyński, *Chemical Reviews*, 2010, **110**, 4303-4356.
117. F. van de Velde and L. Konemann, *Chemical Communications*, 1998, DOI: 10.1039/A804702B, 1891-1892.
118. A. Pordea, M. Creus, J. Panek, C. Duboc, D. Mathis, M. Novic and T. R. Ward, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 8085-8088.
119. A. Mahammed and Z. Gross, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 2883-2887.
120. J. Tang, F. Huang, Y. Wei, H. Bian, W. Zhang and H. Liang, *Dalton Transactions*, 2016, **45**, 8061-8072.
121. R.-P. Pierre, B. Constance, M.-D. Caroline, J.-R. Adeline, M. Lydie, F.-C. J. C., C. Christine and M. Stéphane, *ChemBioChem*, 2009, **10**, 545-552.
122. L. Rondot, E. Girgenti, F. Oddon, C. Marchi-Delapierre, A. Jorge-Robin and S. Ménage, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2016, **416**, 20-28.
123. R. Rémy, L. Edyta, P. Fabio and M. Jean-Pierre, *European Journal of Biochemistry*, 2004, **271**, 1277-1283.
124. S. de Lauzon, B. Desfosses, D. Mansuy and J.-P. Mahy, *FEBS Letters*, 1999, **443**, 229-234.
125. E. Sansiaume, R. Ricoux, D. Gori and J.-P. Mahy, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2010, **21**, 1593-1600.
126. K. Lee, J. M. Brand and D. T. Gibson, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, **212**, 9-15.
127. T. Ueno, T. Koshiyama, M. Ohashi, K. Kondo, M. Kono, A. Suzuki, T. Yamane and Y. Watanabe, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 6556-6562.
128. C. Fabrizio and T. J. Henrique, *ChemSusChem*, 2009, **2**, 508-534.
129. A. Fernández-Gacio, A. Codina, J. Fastrez, O. Riant and P. Soumillion, *ChemBioChem*, 2006, **7**, 1013-1016.
130. M. Allard, C. Dupont, V. M. Robles, N. Doucet, A. Lledós, J. D. Maréchal, A. Urvoas, J. P. Mahy and R. Ricoux, *ChemBioChem*, 2012, **13**, 240-251.
131. A. Kantz and G. T. Gassner, *Biochemistry*, 2011, **50**, 523-532.
132. A. Ilie and M. T. Reetz, *Israel Journal of Chemistry*, 2015, **55**, 51-60.
133. C. Letondor, N. Humbert and T. R. Ward, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**, 4683-4687.
134. C. Marc, P. Anca, R. Thibaud, S. Alessia, L. Christophe, I. Anita, L. Isolde, S. R. E. and W. T. R., *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, **47**, 1400-1404.
135. P. Dydio, H. M. Key, A. Nazarenko, J. Y.-E. Rha, V. Seyedkazemi, D. S. Clark and J. F. Hartwig, *Science*, 2016, **354**, 102-106.
136. M. Jeschek, R. Reuter, T. Heinisch, C. Trindler, J. Klehr, S. Panke and T. R. Ward, *Nature*, 2016, **537**, 661.
137. D. N. Tran and K. J. Balkus, *ACS Catalysis*, 2011, **1**, 956-968.

138. J. M. Nelson and E. G. Griffin, *Journal of the American Chemical Society*, 1916, **38**, 1109-1115.
139. N. R. Mohamad, N. H. C. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop and R. A. Wahab, *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 2015, **29**, 205-220.
140. S. Hudson, J. Cooney, B. K. Hodnett and E. Magner, *Chemistry of Materials*, 2007, **19**, 2049-2055.
141. E. Katchalski-Katzir and D. M. Kraemer, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, **10**, 157-176.
142. A. G. Cunha, G. Fernández-Lorente, J. V. Bevilacqua, J. Destain, L. M. C. Paiva, D. M. G. Freire, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisán, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, **146**, 49-56.
143. Y. Zhang, H. Wu, J. Li, L. Li, Y. Jiang, Y. Jiang and Z. Jiang, *Chemistry of Materials*, 2008, **20**, 1041-1048.
144. D. Avnir, S. Braun, O. Lev and M. Ottolenghi, *Chemistry of Materials*, 1994, **6**, 1605-1614.
145. C.-H. Lee, T.-S. Lin and C.-Y. Mou, *Nano Today*, 2009, **4**, 165-179.
146. T. Le, S. Chan, B. Ebaid and M. Sommerhalter, *Journal of Nanotechnology*, 2015, **2015**, 10.
147. D. Avnir, *Accounts of Chemical Research*, 1995, **28**, 328-334.
148. E.-K. Yan, H.-L. Cao, C.-Y. Zhang, Q.-Q. Lu, Y.-J. Ye, J. He, L.-J. Huang and D.-C. Yin, *RSC Advances*, 2015, **5**, 26163-26174.
149. R. A. Sheldon, *Organic Process Research & Development*, 2011, **15**, 213-223.
150. U. Hanefeld, *Chemical Society Reviews*, 2013, **42**, 6308-6321.
151. L. Cao, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon, *Organic Letters*, 2000, **2**, 1361-1364.
152. I. Correia, S. Aksu, P. Adão, J. C. Pessoa, R. A. Sheldon and I. W. C. E. Arends, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2008, **102**, 318-329.
153. A. L. Margolin and M. A. Navia, *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, **40**, 2204-2222.
154. N. L. St. Clair and M. A. Navia, *Journal of the American Chemical Society*, 1992, **114**, 7314-7316.
155. J. J. Lalonde, M. Navia and A. L. Margolin, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1997, vol. 286, pp. 443-464.
156. R. A. Persichetti, N. L. S. Clair, J. P. Griffith, M. A. Navia and A. L. Margolin, *Journal of the American Chemical Society*, 1995, **117**, 2732-2737.
157. I. Luiz de Mattos, L. V. Lukachova, L. Gorton, T. Laurell and A. A. Karyakin, *Talanta*, 2001, **54**, 963-974.
158. M. Ayala, E. Horjales, M. A. Pickard and R. Vazquez-Duhalt, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **295**, 828-831.
159. H. Tabe, S. Abe, T. Hikage, S. Kitagawa and T. Ueno, *Chemistry – An Asian Journal*, 2014, **9**, 1373-1378.
160. *U.S. Pat.*, 5,618,710, 1997.
161. J.-C. Wasilke, S. J. Obrey, R. T. Baker and G. C. Bazan, *Chemical Reviews*, 2005, **105**, 1001-1020.
162. C. Grondal, M. Jeanty and D. Enders, *Nature Chemistry*, 2010, **2**, 167.
163. A. Guerrero-Corella, A. Maria Martinez-Gualda, F. Ahmadi, E. Ming, A. Fraile and J. Aleman, *Chemical Communications*, 2017, **53**, 10463-10466.
164. C. B. M., C. N. S., M. Sateesh and K. M. L., *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, **40**, 4619-4623.
165. M. J. Climent, A. Corma, S. Iborra and M. J. Sabater, *ACS Catalysis*, 2014, **4**, 870-891.
166. N. Ladkau, A. Schmid and B. Bühler, *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, **30**, 178-189.
167. R. C. Simon, N. Richter, E. Busto and W. Kroutil, *ACS Catalysis*, 2014, **4**, 129-143.
168. V. Köhler and N. J. Turner, *Chemical Communications*, 2015, **51**, 450-464.
169. J. Muschiol, C. Peters, N. Oberleitner, M. D. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer and F. Rudroff, *Chemical Communications*, 2015, **51**, 5798-5811.
170. S. P. France, L. J. Hepworth, N. J. Turner and S. L. Flitsch, *ACS Catalysis*, 2016, DOI: 10.1021/acscatal.6b02979, 710-724.

171. S. Wu, Y. Zhou, T. Wang, H.-P. Too, D. I. C. Wang and Z. Li, *Nature Communications*, 2016, **7**, 11917.
172. S. P. France, S. Hussain, A. M. Hill, L. J. Hepworth, R. M. Howard, K. R. Mulholland, S. L. Flitsch and N. J. Turner, *ACS Catalysis*, 2016, **6**, 3753-3759.
173. H. Yun and B.-G. Kim, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, **13**, 372.
174. G. Grogan and N. J. Turner, *Chemistry – A European Journal*, 2016, **22**, 1900-1907.
175. J. H. Sattler, M. Fuchs, K. Tauber, F. G. Mutti, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas and W. Kroutil, *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, **51**, 9156-9159.
176. Y. Wang and H. Zhao, *Catalysts*, 2016, **6**, 194.
177. J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall and W. Kroutil, *Chemical Reviews*, 2018, **118**, 270-348.
178. M. Makkee, A. P. G. Kieboom, H. Van Bekkum and J. A. Roels, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1980, DOI: 10.1039/C39800000930, 930-931.
179. D. C. A., H. Hua, B. M. J., L. Lu, T. Yichen, Z. Huimin and H. J. F., *Angewandte Chemie*, 2014, **126**, 475-479.
180. V. Köhler, Y. M. Wilson, M. Dürrenberger, D. Ghislieri, E. Churakova, T. Quinto, L. Knörr, D. Häussinger, F. Hollmann, N. J. Turner and T. R. Ward, *Nature Chemistry*, 2012, **5**, 93.
181. M. V. Cherrier, L. Martin, C. Cavazza, L. Jacquamet, D. Lemaire, J. Gaillard and J. C. Fontecilla-Camps, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 10075-10082.
182. J. J. Irwin and B. K. Shoichet, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2005, **45**, 177-182.
183. G. Türkoglu, S. Tampier, F. Strinitz, F. W. Heinemann, E. Hübner and N. Burzlaff, *Organometallics*, 2012, **31**, 2166-2174.

Chapitre II

Chapitre II : Conception de nouvelles métalloenzymes artificielles pour l'oxydation

1. Conception d'une nouvelle métalloenzyme artificielle pour l'oxydation d'alcools primaires

1-1. Introduction

L'oxydation d'alcools primaires en aldéhydes, cétones ou acides carboxyliques est une des classes de réactions d'oxydation les plus utilisées en synthèse organique. De nombreux systèmes efficaces ont déjà été synthétisés pour ces réactions.¹⁸⁴ Dans un contexte de chimie durable, de nouvelles méthodes plus éco-compatibles doivent être développées. Pour cela, l'oxygène moléculaire serait l'oxydant idéal et des progrès considérables ont été réalisés dans la mise au point de méthodes catalytiques pour l'oxydation aérobie d'alcool.¹⁸⁵

En 2011, Stahl *et al.* ont synthétisé un système catalytique à base de Cu(I) pour l'oxydation d'alcools en aldéhydes.¹⁸⁶ Ce système catalytique, composé de Cu(OTf) (5 mol%), de bipyridine (5 mol%), de TEMPO (5 mol%) et de 1-méthylimidazole (NMI, 10 mol%), possède une très haute sélectivité pour les alcools primaires et peut oxyder une grande variété de substrats comme des alcools benzyliques primaires, allyliques ou aliphatiques (**Schéma II-1**).

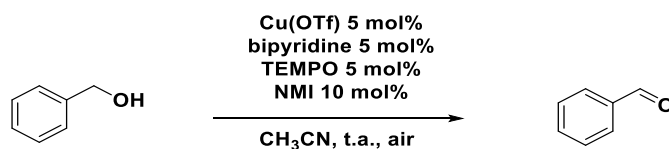


Schéma II-1 : Conditions réactionnelles pour l'oxydation d'alcool.

Cette méthode est compatible avec de nombreux substrats possédant une grande variété de groupements fonctionnels importants comme des groupements hétéroatomiques, des alcynes, des alcènes, des éthers, des thioéthers et des anilines ou encore des alcools secondaires non protégés. De plus, la réaction est réalisée à l'air, dans un solvant organique standard (CH₃CN)

et tous ses composants catalytiques sont peu coûteux, stables et commerciaux. En 2013, le mécanisme réactionnel proposé par Stahl *et al.* débuterait avec l'activation d'O₂ par le complexe de Cu(I) pour former l'intermédiaire Cu(II)-superoxo (**Schéma II-2, étape 1**).

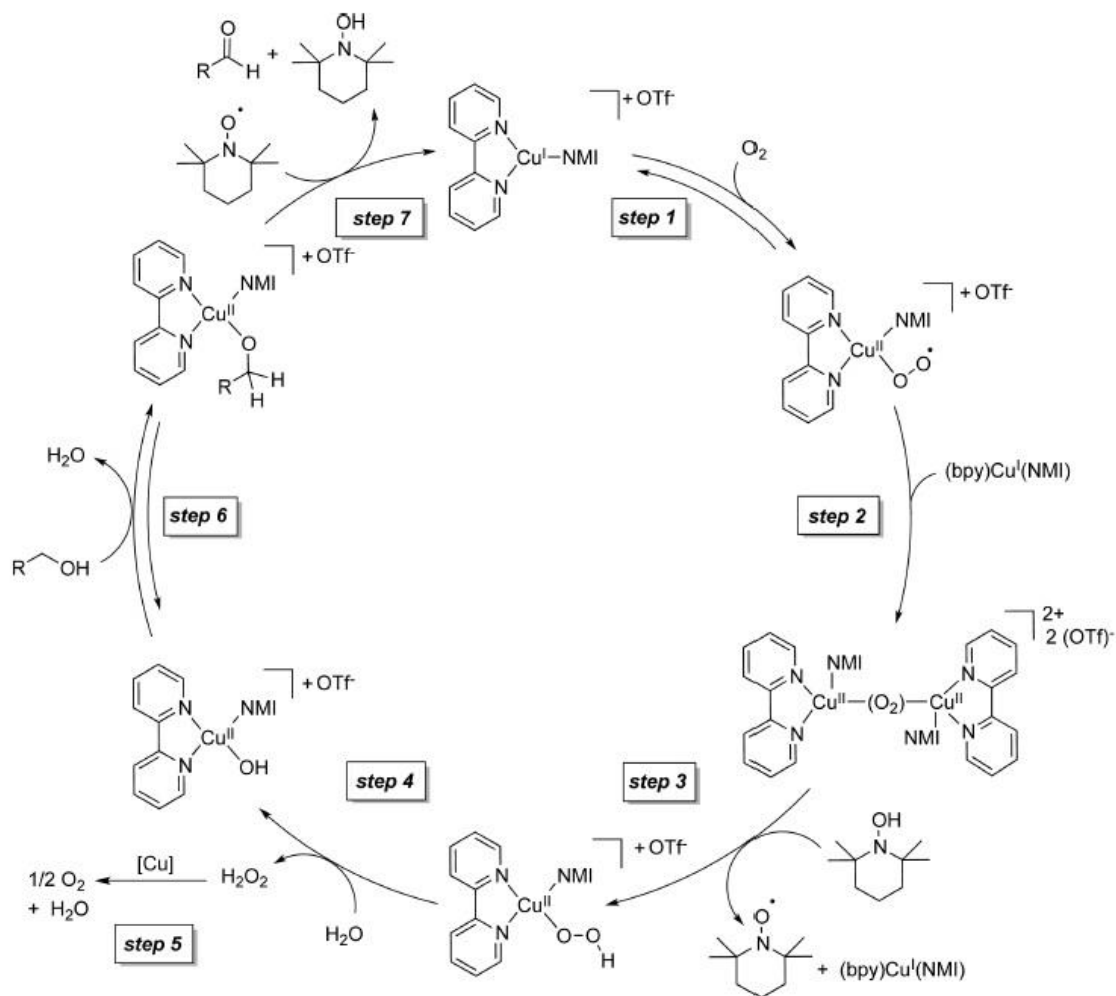


Schéma II-2 : Mécanisme réactionnel proposé pour l'oxydation de l'alcool benzylique par un complexe de cuivre.

Ensuite, en présence d'un deuxième complexe de Cu(I) et de 2,2,6,6-tétraméthylpiperidin-1-ol, cette espèce évoluerait en Cu(II)-hydroperoxo (**étapes 2 et 3**). La présence d'H₂O permettrait la libération d'H₂O₂ et la formation de l'espèce Cu(II)-OH (**étape 4**) capable de réagir avec l'alcool benzylique afin de former l'intermédiaire Cu(II)-alkoxyde (**étape 6**). La dernière étape serait l'oxydation de l'alcool en présence de TEMPO impliquant un transfert simultané de deux électrons, l'un vers le cuivre et l'autre vers le nitroxyde (**étape 7**).

Ce système catalytique possède quatre entités distinctes : le complexe de cuivre, le NMI, le nitroxyde et le substrat. Pour que la catalyse d'oxydation soit efficace, il est nécessaire que ces quatre entités se rencontrent pour réagir. Hormis le substrat, les trois autres entités sont en faible concentration (< 10 mol% par rapport au substrat). La baisse simultanée de la quantité de ces trois composants entrainerait donc une diminution drastique de l'activité catalytique. Les valeurs minimales requises pour réaliser ce type de catalyse d'oxydation ont été décrites par Stahl *et al.* en 2015, avec l'utilisation de 5 mol% de complexe et de 1 mol% de nitroxyde par mole de substrat.¹⁸⁷ Finalement, l'intérêt est de trouver un système catalytique où les trois composants sont reliés ensemble. Dans ce cadre, Blandin *et al.* ont lié covalamment le nitroxyde et le complexe de cuivre permettant d'améliorer l'activité catalytique (**Schéma II-3, a**).^{188, 189} Ces catalyseurs ont pu être testés dans le cadre d'une réaction de désymétrisation atroposélective d'un diol permettant d'atteindre un excès énantiomérique convaincant de 65% (**Schéma II-3, b**).

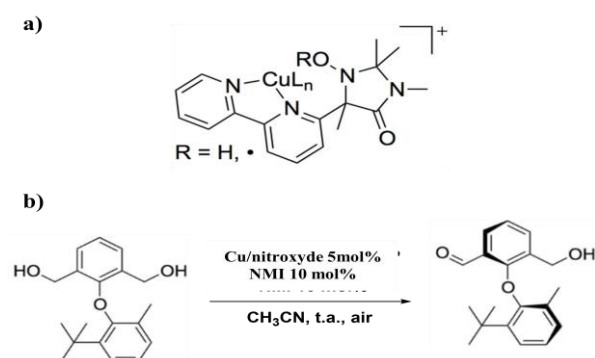


Schéma II-3 : a) Complexes obtenus en mixant le sel de cuivre et les ligands bipyridine/nitroxyde. b) Conditions réactionnelles pour la réaction de désymétrisation atroposélective.

Une autre solution envisagée serait de fixer les différents composants du système catalytique ensemble dans la cavité d'une protéine. Ce projet pourrait permettre d'obtenir une activité catalytique avec des quantités très faibles en catalyseur. De plus, la protéine pourrait induire un environnement chiral permettant d'améliorer les excès énantiomériques obtenus. Dans ce contexte, une collaboration avec Véronique Blandin de l'équipe SeRCO (Synthèse et Réactivité en Chimie Organique) du Département de Chimie Moléculaire à Grenoble a été entreprise. Cette collaboration avait pour buts de : (i) créer un nouvel hybride, en insérant un système catalytique Cu/nitroxyde au sein d'une protéine, pour réaliser des oxydations énantiosélectives en activant O₂, (ii) réaliser cette réaction dans l'eau dans le cadre d'une

chimie durable, (iii) étudier les mécanismes d'oxydation mis en jeu, (iv) développer une réaction énantiosélective.

Dans un premier temps, un travail d'optimisation des conditions réactionnelles de Stahl *et al.* a été réalisé afin de tester la réactivité du système originel en milieu aqueux (nécessaire pour la stabilité de la protéine) et dans des conditions bien plus diluées (limitées par la quantité de protéine que nous pouvons utiliser). Dans un deuxième temps, la conception du premier hybride à base de HSA et du système Cu/bipy/TEMPO/NMI (**HSA/Cu**) a été étudié (caractérisations et tests catalytiques). Dans un troisième temps, la conception d'un second hybride à base de la protéine Nika et d'un système Cu/nitroxyde avec de nouveaux ligands (**Nika/Cu-L**) a été testée.

1-2. Evaluation des conditions réactionnelles

1-2-1. Passage en milieu aqueux

Avant de réaliser le passage en milieu aqueux, l'oxydation de l'alcool benzylique en benzaldéhyde a été testée selon les conditions de Stahl *et al.* : Cu(OTf)/bipy/TEMPO/NMI/substrat 1/1/1/2/20 avec une concentration en catalyseur de 10 mM dans CH₃CN (**Schéma II-4, Tableau II-1, entrée 1**). En 20 minutes de réaction, 100% de l'alcool est converti en benzaldéhyde attestant de l'efficacité de ce système catalytique.

La première difficulté de ce projet a été de déterminer si ce système catalytique était viable en milieu aqueux pour l'oxydation de l'alcool benzylique. D'après Stahl *et al.* la présence d'H₂O dans le milieu réactionnel conduirait à la consommation du cuivre actif par précipitation sous forme d'un dimère *bis-μ*-hydroxyde et d'autres espèces d'hydroxydes de cuivre. Cette caractéristique induirait une diminution de la cinétique d'oxydation et la désactivation du catalyseur (études réalisées sur les substrats aliphatiques).¹⁹⁰

Pour le passage en milieu aqueux, différents paramètres ont dû être pris en compte : (i) les différents réactifs sont déjà préparés en solution dans CH₃CN à 0,1 M, (ii) le mélange final H₂O/CH₃CN ne doit pas contenir plus de 5% de CH₃CN pour la stabilité de la protéine, (iii) il est nécessaire que la quantité d'alcool benzylique soit assez élevée pour être quantifiable en

RMN ¹H. Pour être en accord avec tous ces paramètres, la concentration de catalyseur a dû être diminuée 14 fois (0,715 mM), en diminuant la quantité de substrat par un facteur 2 (toujours quantifiable en RMN) et en augmentant le volume réactionnel d'un facteur 7 (pour obtenir seulement 5% de CH₃CN avec les solutions de réactifs disponibles).

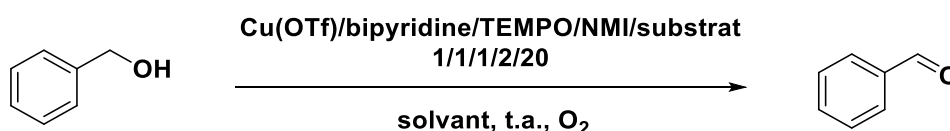


Schéma II-4 : Conditions réactionnelles standard.

La réaction standard dans CH₃CN ([cat] = 10 mM) a donc été comparée avec une concentration de 0,715 mM de catalyseur (**Tableau II-1, entrées 1 et 2**). La variation de la concentration en catalyseur a un gros impact sur l'efficacité de la réaction : en diminuant sa concentration, 34% de rendement en benzaldéhyde est obtenu pour 16 h de réaction contre 100% dans les conditions standard (20 min). Cette réactivité a ensuite pu être comparée à des conditions en milieux aqueux (**Tableau II-1, entrées 3 et 4**). Dans les conditions H₂O/CH₃CN 95/5, le rendement en benzaldéhyde est amélioré (53%) alors que, dans les conditions HEPES/CH₃CN 95/5 (conditions les plus favorables pour la protéine), ce rendement est équivalent (34%).

Tableau II-1 : Différentes conditions réactionnelles pour l'oxydation de l'alcool benzylique en benzaldéhyde.

<i>Entrée</i>	[Cu] (mM)	Solvant	Temps (h)	Rendement (%)
1	10	CH ₃ CN	0,33	100
2	0,715	CH ₃ CN	16	34
3	0,715	H ₂ O/CH ₃ CN 95/5	16	53
4	0,715	HEPES/CH ₃ CN 95/5	16	34
5	0,715	HEPES/CH ₃ CN 95/5	67	80

Pour expliquer la plus faible réactivité dans les conditions HEPES/CH₃CN 95/5, une catalyse d'oxydation a été réalisée sur un temps plus long (67 h) (**Tableau II-1, entrée 5**). Dans ces conditions, 80% de rendement sont obtenus. Ce résultat montre que le manque de réactivité du catalyseur dans ces conditions n'est pas dû à un manque de stabilité de ce dernier mais

plutôt à une interférence entre le tampon et le catalyseur qui ralentirait la cinétique de la réaction.

De plus, il est important de noter qu'en absence de catalyseur, pour ces différentes conditions réactionnelles, aucune réactivité n'a été observée. L'alcool benzylique ne s'oxyde pas à l'air même après 67 h de réaction.

Un premier verrou technologique a donc été levé : la réaction d'oxydation de l'alcool benzylique en benzaldéhyde est possible en milieu aqueux même en diminuant les concentrations en catalyseur et en réactifs. Le tampon HEPES étant préférable pour la stabilité de la protéine, la suite des expériences de catalyse a été réalisée uniquement dans ce tampon.

1-2-2. Variations des différents composants du système catalytique

La deuxième étape du projet avait pour but de déterminer l'influence des différents composants du système catalytique Cu/ligand/TEMPO/NMI sur la réactivité afin de choisir les meilleures conditions (**Figure II-1**).

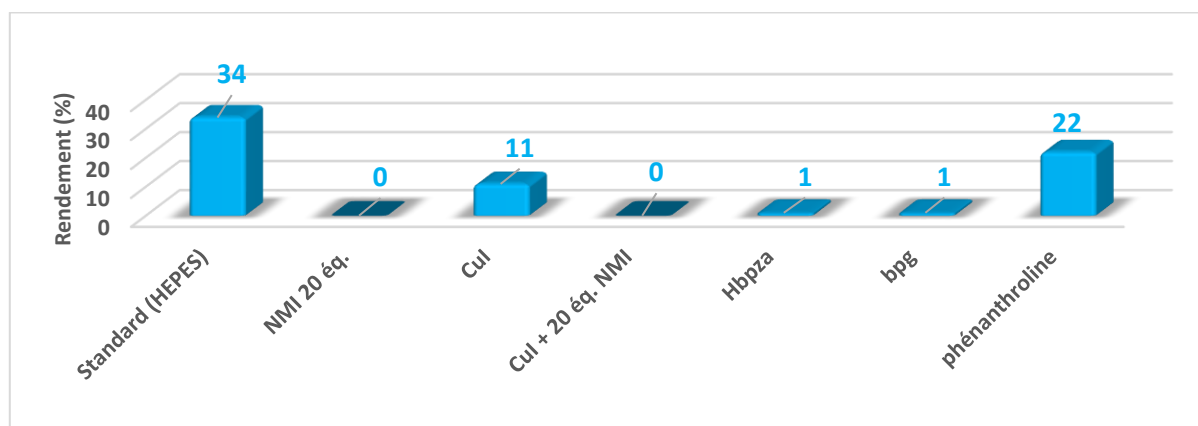


Figure II-1 : Variations des différents composants du système catalytique Cu/ligand/TEMPO/NMI/substrat dans les conditions 0,715 mM de catalyseur, ratio de 1/1/1/x/20, HEPES/CH₃CN 95/5, 16 h.

D'après Stahl *et al.*, le NMI jouerait un rôle primordial dans la formation de l'intermédiaire Cu(II)-alkoxyde (**Schéma II-2, Step 6**). Soit, il déprotonerait le substrat alcool lui permettant de réagir avec le cuivre, soit il stabiliserait le complexe de cuivre permettant au substrat alcool

de réagir directement avec ce dernier.¹⁹⁰ Pour confirmer une de ces hypothèses, une catalyse avec 20 équivalents de NMI (au lieu de 2 éq.) a été réalisée mais aucune réactivité n'a été observée. Ceci pourrait appuyer l'hypothèse du rôle stabilisateur. En effet, si le NMI est en quantité trop importante par rapport au catalyseur, il pourrait stabiliser l'état intermédiaire Cu(II)-OH et bloquer la réaction. Il est donc impératif de se limiter à deux équivalents de NMI.

Ensuite, l'importance du contre-ion a été étudiée. Cu(I) a été comparé à Cu(OTf), sel utilisé dans la réaction standard. L'utilisation de Cu(I) entraîne une diminution de la réactivité du système catalytique formé (11% de rendement contre 34% pour Cu(OTf)). Une explication plausible est le manque de solubilité du Cu(I) lors de son ajout en milieu HEPES/CH₃CN 95/5. En comparaison, le Cu(OTf) est totalement soluble dans ce milieu ce qui facilite la formation du système catalytique et donc favorise la réaction.

Enfin, deux autres ligands ont été testés sur cette réactivité à la place de la bipyridine : les ligands Hbpza (acide *bis*-(pyrazol-1-yl)acétique) et bpg (*bis*(2-pyridylméthyl)glycine) (**Figure II-2, a et b**), qui possèdent un bras carboxylate permettant l'ancrage supramoléculaire dans la protéine NikA *via* la formation d'un pont salin avec l'Arg137, et le ligand phénanthroline, qui possède trois cycles aromatiques hydrophobes permettant l'ancrage dans la protéine HSA *via* diverses interactions hydrophobes. Aucune réactivité n'a été observée avec les ligands Hbpza et bpg alors que le ligand phénanthroline conduit à des rendements relativement intéressants (22%) mais plus faibles que ceux obtenus avec la bipyridine (34%) dans les mêmes conditions réactionnelles.

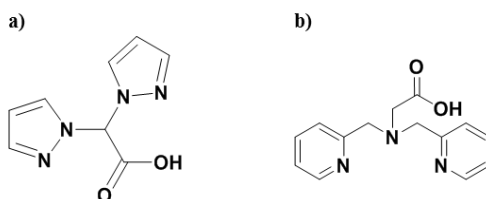


Figure II-2 : a) ligand Hbpza. b) ligand bpg.

En conclusion, le système catalytique Cu(OTf)/bipyridine/TEMPO/NMI/substrat dans les conditions 1/1/1/2/20 possède les meilleures propriétés catalytiques pour cette réactivité, même en milieu aqueux.

1-2-3. Mise à l'échelle pour le passage en milieu protéique

La troisième étape du projet était la mise à l'échelle des conditions réactionnelles pour le passage aux tests avec la protéine. En effet, pour pouvoir travailler en milieu protéique, trois paramètres étaient à prendre en compte : (i) la diminution de la quantité de catalyseur (ii) la modification de la méthode d'analyse due à la diminution de la quantité de substrat utilisée (GC/MS au lieu de RMN) et (iii) la diminution du volume réactionnel (de 7 mL à 150 μ L). En général, les catalyses avec des enzymes sont réalisées à de faibles concentrations (de 10 à 100 μ M).

Les réactions de catalyse ont été réalisées avec différentes concentrations en catalyseur (système Cu/bipyridine/NMI/TEMPO), pour différents temps de réaction (16, 67 et 85 h) (**Tableau II-2**) et dans un volume réactionnel de 150 μ L. La concentration en substrat reste identique pour chacune des réactions de catalyse (14,3 mM). Comme précédemment, la diminution de la concentration en catalyseur conduit à des rendements plus faibles : pour des concentrations de 0,286 mM, 0,143 mM et 0,072 mM, les rendements en benzaldéhyde sont de 11%, 4% et 0%, respectivement, pour 16 h de réaction (**Tableau II-2, entrées 3, 5 et 7**). Les catalyses ont ensuite été réalisées sur un temps plus long (67 ou 85 h). Pour les concentrations 0,715 mM, 0,286 mM et 0,143 mM, les rendements sont améliorés (80%, 29% et 11% respectivement) (**Tableau II-2, entrées 2, 4 et 6**). En revanche, pour la concentration 0,072 mM, la réactivité reste quasi nulle (**Tableau II-2, entrée 8**). Dans tous les cas, aucun autre produit réactionnel n'est formé.

Tableau II-2 : Variation de la concentration du système catalytique.

<i>Entrée</i>	[Cu] (mM)	Ratio	Temps (h)	Rendement (%)
1	0,715	1/1/2/1/20	16	34
2	0,715	1/1/2/1/20	67	80
3	0,286	1/1/2/1/50	16	11
4	0,286	1/1/2/1/50	85	29
5	0,143	1/1/2/1/100	16	4
6	0,143	1/1/2/1/100	85	11
7	0,072	1/1/2/1/200	16	0
8	0,072	1/1/2/1/200	85	2

Catalyses réalisées dans HEPES/CH₃CN95/5 pour un ratio Cu/bipy/TEMPO/NMI/substrat de 1/1/1/2/20.

Les hybrides étant formés *in situ*, il est nécessaire, dans la mesure du possible, de trouver des conditions réactionnelles où le complexe seul ne possède pas d'activité catalytique. Sinon, il sera difficile de discriminer si la réactivité provient du complexe seul en solution (non fixé dans la protéine) ou de l'hybride formé. De plus, cette deuxième étape du projet a permis de mettre en place des conditions réactionnelles où la quantité de catalyseur ne soit pas trop élevée pour travailler avec des protéines (0,143 mM et 0,072 mM). De plus, le volume réactionnel a été ajusté et une méthode d'analyse sur GC/MS a été mise en place.

1-3. Caractérisation et tests de réactivité de l'hybride HSA/Cu

1-3-1. Caractérisation de l'hybride

Des études en spectroscopie UV-visible ont été réalisées afin de déterminer si le complexe **Cu-bipyridine** s'ancrait dans la protéine. Pour cela, la protéine HSA (2 mM) a été incubée 30 minutes en présence des différents composants catalytiques (Cu, bipy, NMI, TEMPO) (2 mM) ou **Cu(OTf)** (2 mM) à partir de solutions aqueuses (HEPES/CH₃CN 95/5) (**Figure II-3**).

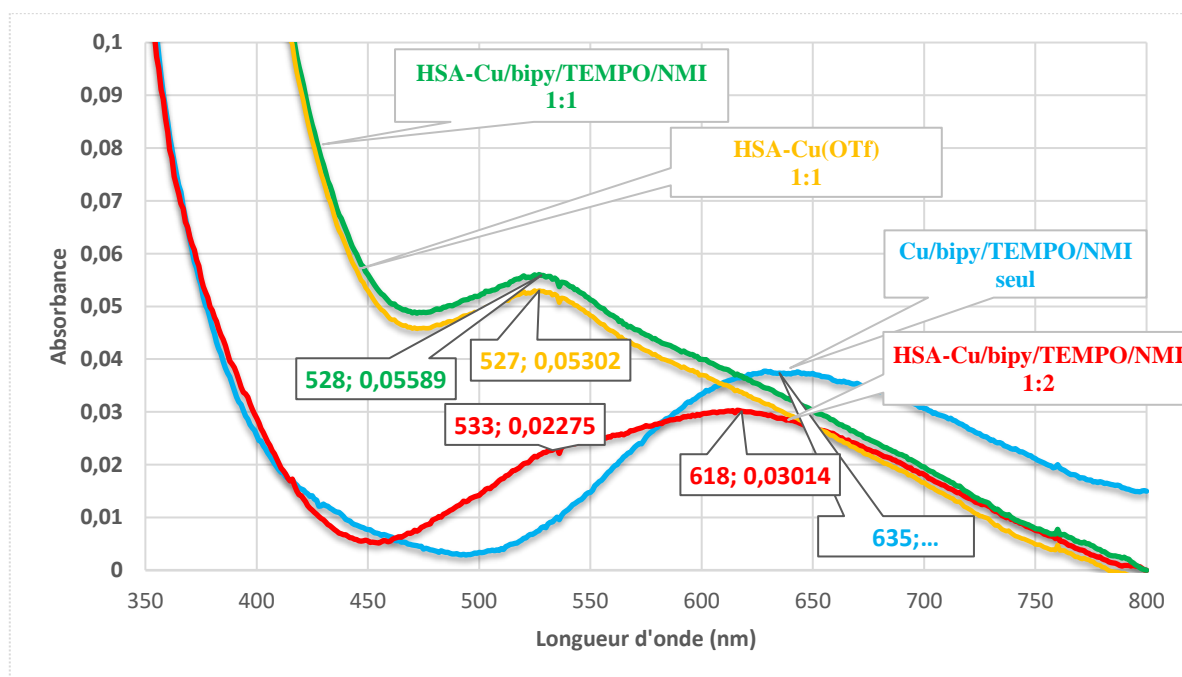


Figure II-3 : Etude UV-Visible de l'évolution du mélange à base de cuivre dans HEPES/CH₃CN 95/5 en présence d'HSA. En bleu, le système catalytique

Cu/bipyridine/NMI/TEMPO, en rouge, le mélange Cu/bipyridine/NMI/TEMPO initial en présence de 0,5 éq. d'HSA, en vert, le mélange Cu/bipyridine/NMI/TEMPO en présence d'un équivalent d'HSA et en jaune, le sel de cuivre Cu(OTf) en présence d'un équivalent d'HSA.

Le spectre UV-visible du mélange Cu+bipy+NMI+TEMPO, avant ajout de la protéine HSA, présente une large bande d'absorbance à 635 nm correspondant à une bande de transfert de charge entre le cuivre et la bipyridine (**courbe bleue**). Lorsque 0,5 équivalent de la protéine HSA est incubé avec un équivalent de ce mélange, une nouvelle bande d'absorption de transfert de charge apparaît à 533 nm (**courbe rouge**) ce qui correspondrait à la formation d'une nouvelle espèce. De plus, la bande d'absorption présente initialement à 635 nm s'est déplacée à 618 nm et a diminué en intensité de 19%. Ce déplacement correspondrait à un changement dans la sphère de coordination du cuivre. Pour vérifier ces hypothèses, un équivalent de la protéine HSA a été incubé avec un équivalent du mélange (**courbe verte**). L'absorbance de la bande à 533 nm est environ deux fois plus importante que celle avec 0,5 équivalent d'HSA (avec $\epsilon = 26,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ contre $\epsilon = 11,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et la bande à 635 nm a disparu attestant que le cuivre s'est entièrement fixé. Ensuite, la même expérience a été réalisée avec le sel de **Cu(OTf)** (avec un équivalent de protéine et un équivalent de **Cu(OTf)** (**courbe jaune**). Il s'avère que la même espèce catalytique est formée avec l'apparition de la bande à 527 nm et avec une absorbance équivalente ($\epsilon = 27,9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Ces expériences de spectroscopie UV-Visible semble indiquer que le cuivre se fixe dans HSA sans le ligand bipyridine. Des tests catalytiques doivent être réalisés afin de déterminer si l'hybride HSA/Cu sans bipyridine peut être actif pour l'oxydation de l'alcool benzylique.

1-3-2. Tests catalytiques en présence de la protéine HSA

Pour ces tests catalytiques, un équivalent de protéine est incubé avec du mélange Cu/bipyridine/NMI/TEMPO pendant 30 minutes.

Dans un premier temps, la réaction est réalisée dans le tampon HEPES/CH₃CN 95/5 pendant 16 h avec deux concentrations de catalyseur différentes : 0,143 mM et 0,072 mM (**Tableau II-3, entrées 1 à 4**). Aucune réactivité n'est observée lors de ces deux réactions de catalyse avec ou sans la protéine HSA. Pour comprendre ces résultats, une nouvelle expérience de catalyse en présence de la protéine HSA avec 0,143 mM de catalyseur a été réalisée sur 85 h

(**Tableau II-3, entrée 5 et 6**). Cette fois, en présence d'HSA, aucune réactivité n'est observée alors que le système catalytique seul est capable de former 15% de benzaldéhyde. Une dernière réaction de catalyse a été testée avec des quantités plus importantes en catalyseur (0,286 mM) en présence et en absence de protéine sur 16 h de réaction (**Tableau II-3, entrées 7 et 8**). La même tendance est observée avec une réactivité nulle en présence de protéine alors que le système catalytique seul est capable de former 29% de benzaldéhyde.

Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle l'ion métallique cuivre se fixe seul au sein de la protéine HSA ce qui induit une inhibition de l'activité catalytique. Comme nous avons pu l'observer, le ligand est très important dans la réactivité (*cf* ligands Hbpza, bpg et phénanthroline). Si le cuivre n'est pas fixé à la bipyridine, aucune réactivité ne peut être observée comme le montre ces différentes expériences de catalyse.

Tableau II-3 : Comparaison des catalyses d'oxydation avec et sans la protéine HSA.

<i>Entrée</i>	[Cu] (mM)	HSA	Ratio ^[a]	Temps	Rendement (%)
1	0,143	-	1/1/2/1/100	16 h	4
2	0,072	-	1/1/2/1/200	16 h	0
3	0,143	+	1/1/2/1/100	16 h	0
4	0,072	+	1/1/2/1/200	16 h	0
5	0,143	-	1/1/2/1/100	85 h	15
6	0,143	+	1/1/2/1/100	85 h	0
7	0,286	-	1/1/2/1/50	16 h	29
8	0,286	+	1/1/2/1/50	16 h	0

Catalyses réalisées dans le milieu HEPES/CH₃CN 95/5.^[a] ratio = Cu/bipyridine/NMI/TEMPO/substrat.

1-4. Caractérisations et tests de réactivité de l'hybride NikA/Cu

La protéine HSA n'était donc pas un bon candidat pour développer une nouvelle métalloenzyme artificielle avec le cuivre. En effet, l'affinité du cuivre pour un ligand de type bipyridine est trop faible comparée à celle pour la protéine. Une nouvelle stratégie de développement s'est donc imposée : tester la réactivité du cuivre avec une nouvelle protéine, NikA. Pour rappel, l'ancrage d'un complexe inorganique au sein de cette protéine nécessite la présence d'un groupement carboxylate. Pour développer ce système, deux ligands possédant

un groupement carboxylate pouvaient être utilisés : le ligand Hbpza et le ligand bpg. Le ligand Hbpza présentant une très faible solubilité en milieu aqueux, les études se sont concentrées sur le ligand bpg. Les travaux précédents de l'équipe ont en effet montré qu'un complexe inactif en milieu homogène pouvait l'être au sein de la protéine Nika.¹¹

Des études de spectroscopie UV-Visible ont été réalisées afin de déterminer si le complexe **Cu-bpg** était capable de se fixer dans la protéine Nika. Pour cela, quatre solutions ont été préparées à 100 μM dans HEPES/ CH_3CN 95/5 : une solution de sel de $\text{Cu}(\text{OTf})$, une solution du complexe **Cu-bpg**, une solution de la protéine Nika en présence du sel de $\text{Cu}(\text{OTf})$ et une solution de la protéine Nika en présence de **Cu-bpg**. La protéine est incubée avec le complexe ou l'ion métallique pendant 30 minutes avant de réaliser les spectres (**Figure II-4**).

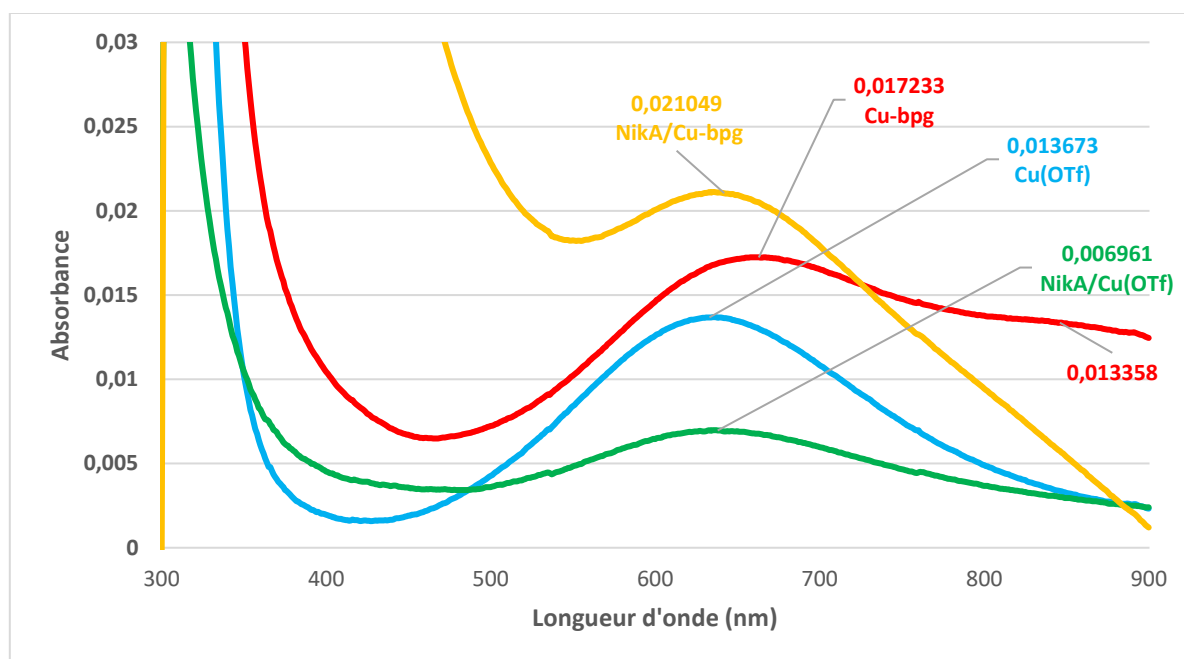


Figure II-4 : Étude UV-Visible du complexe **Cu-bpg** dans HEPES/ CH_3CN 95/5 en présence de Nika. $\text{Cu}(\text{OTf})$ en bleu, le complexe **Cu-bpg** en rouge, $\text{Cu}(\text{OTf})$ en présence d'un équivalent de Nika en vert et le complexe **Cu-bpg** en présence d'un équivalent de Nika en jaune.

Le spectre du sel de $\text{Cu}(\text{OTf})$ présente une bande d'absorption à 636 nm ($\epsilon = 137 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, **courbe bleue**) correspondant à une bande de transfert de charge entre l'atome de cuivre et les ligands H_2O . Lorsque le cuivre est mis en présence du ligand bpg (**courbe rouge**), la bande de transfert de charge se déplace à 668 nm ($\epsilon = 170 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et une nouvelle bande apparaît à

849 nm qui correspondrait à une bande de transition d-d du cuivre. Lorsque la protéine NikA est incubée avec Cu(OTf), la bande d'absorption est centrée sur 642 nm (**courbe verte**), ce qui est équivalent à la bande d'absorption au Cu(OTf) seul. Dans le cas où la protéine NikA est incubée avec le complexe **Cu-bpg**, la même bande d'absorption que celle caractéristique du Cu(OTf) est présente (636 nm, **courbe jaune**) mais avec une absorbance très différente ($\epsilon = 210 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour **NikA-Cu/bpg** 1:1 et $\epsilon = 70 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour **NikA-Cu(OTf)** 1/1). Une nouvelle espèce est donc obtenue ne correspondant ni à la fixation du cuivre seul ni à la fixation du complexe **Cu-bpg** dans la protéine NikA et a donc été testée en catalyse d'oxydation de l'alcool benzylique.

Suite à ces résultats, des tests catalytiques dans les conditions standard ont été réalisés mais ont été infructueux. Ni le complexe **Cu-bpg** seul ni le mélange entre l'hybride **NikA/Cu-bpg** n'ont conduit à la conversion de l'alcool en un autre produit réactionnel (aldéhyde ou autres).

1-5. Conclusion

La conception d'un nouvel hybride à base de cuivre s'est avérée infructueuse. En effet, le cuivre a certainement une meilleure affinité avec HSA plutôt qu'avec des ligands de type bipyridine, phénanthroline ou Hbpza. De ce fait, les tests catalytiques réalisés en présence de protéine n'ont mené à aucune conversion.

En revanche, ces résultats ont permis de démontrer que l'utilisation d'H₂O, plutôt qu'un solvant organique pour l'oxydation de l'alcool benzylique par O₂, dans les conditions de Stahl *et al.*, n'inhibait pas la réactivité et ne conduisait pas à l'inactivation du catalyseur même après 96 h de réaction. Au contraire, lorsque la concentration en catalyseur est diluée 14 fois, ce système catalytique est plus efficace dans H₂O que dans CH₃CN (53% vs 34% en 16 h de réaction). De plus, cela permet d'utiliser un solvant plus éco-compatible.

2. Conception d'une nouvelle métalloenzyme artificielle pour l'hydroxychloration d'alcènes

2-1. Introduction

La conception de catalyseurs « verts » et efficaces pour la conversion d'alcènes en molécules complexes permettrait de simplifier les chemins de synthèse actuels utilisés en industrie.¹⁹¹ Notamment, de nombreuses recherches ont été entreprises pour produire des intermédiaires réactionnels tels que des halogénohydrines, synthons chiraux très utilisés en chimie fine et dans les industries pharmaceutiques et agroalimentaires.^{192, 193} Par exemple, la synthèse industrielle de l'oxyde de propylène passe par la formation de l'intermédiaire chlorhydrine en faisant réagir l'alcène avec HOCl.¹⁹⁴ En revanche, cette procédure est corrosive et conduit à la formation de nombreux produits dérivés comme des diols ou des dihalogènes. Pour améliorer les sélectivités et la toxicité de ce type de réaction, des procédés alternatifs basés sur l'utilisation de métaux ont donc été développés. Par exemple, en catalyse homogène, P. M. Henry *et al.* ont synthétisé un complexe bimétallique de palladium (II) à base de ligands chiraux de diphosphines pour l'oxydation d'alcènes en chlorhydrines à partir de chlorure de cuivre (II) et de chlorure de lithium. Ce système permet d'atteindre plus de 300 TON avec des excès énantiomériques allant jusqu'à 94% dans le cas du propène mais avec une régiosélectivité faible.¹⁹⁵

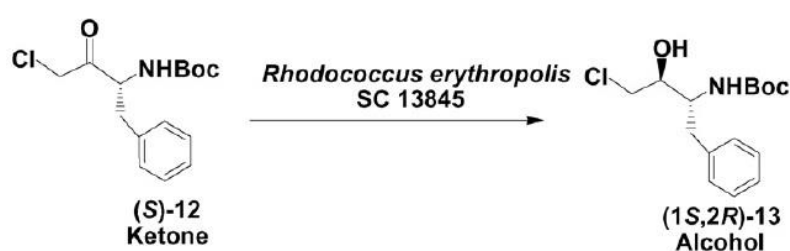


Figure II-5 : Réduction enzymatique diastéréosélective de l'ester diméthylé de l'acide (1S)-[3-chloro-2-oxo-1-(phénylméthyl)propyl]carbamique.

Une autre solution permettant d'améliorer les sélectivités et la toxicité de la réaction est l'utilisation de biocatalyseurs, comme le montre les travaux de Patel *et al.*⁵ Dans cette étude, ils ont montré la réduction enzymatique diastéréosélective d'une cétone α -chlorée en chlorhydrine, en présence de la lignée de *Rhodococcus erythropolis* SC13845 et de NaBH₄

(**Figure II-5**). D'excellents rendements et d'excellentes sélectivités sont obtenus pour cette réaction (> 90% de rendement, un excès diastéréoisomérique > 98% et un excès énantiomérique > 99%).

Un seul exemple de diaddition électrophile réalisée par une métalloenzyme artificielle a été décrit.¹⁹⁶ Dans cette étude, la dihydroxylation énantiosélective de l' α -méthylstyrène est réalisée en insérant un complexe à base d'osmium au sein de la streptavidine. Dans ce cadre, un excès énantiomérique de 95% en faveur de l'énantiomère *R* est obtenu mais avec une efficacité modérée (27 TON).

2-2. Synthèse et caractérisations de l'hybride NikA/Ru-bpza

A ce jour, la production de chlorhydrines énantiosélectives *via* l'utilisation de métalloenzyme artificielle n'a pas encore été démontrée. Dans ce cadre, une collaboration a été entreprise avec N. Burzlaff *et al.*, qui ont mis au point des catalyseurs homogènes bio-inspirés mimant le site actif des oxygénases.¹⁸³ En milieu organique, le catalyseur **Ru-bpza** (bpza = acide bis-(pyrazol-1-yl)acétique) (**Figure II-6**) a sa propre réactivité en réalisant une réaction d'époxydation sur le cyclohexène en présence d'iodosylbenzène avec un rendement de 69%.¹⁹⁷ En revanche, le complexe se décompose rapidement en solvant organique et réalise seulement 21 TON.

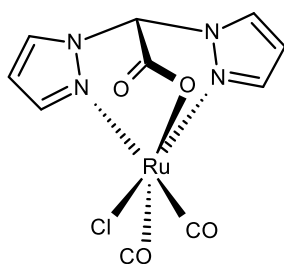


Figure II-6 : Représentation du complexe de Ru-bpza.

Afin d'améliorer sa stabilité et d'utiliser des conditions réactionnelles plus douces, l'introduction du complexe de **Ru-bpza** au sein de la protéine NikA afin de former l'hybride **NikA/Ru-bpza** paraît être une stratégie intéressante pour la conception d'une nouvelle métalloenzyme pour la formation d'espèces difonctionnalisées telles que des chlorhydrines.

Les synthèses et les caractérisations du complexe **Ru-bpza** et de l'hybride **NikA/Ru-bpza** étant déjà décrites dans la thèse du Dr. Rondot, ces résultats sont présentés de façon succincte.

2-2-1. Synthèse et caractérisations du complexe Ru-bpza

2-2-1-1. Structure cristallographique

Le complexe **Ru(bpza)(CO)₂Cl** a été synthétisé par déprotonation du ligand Hbpza avec du *tertio*-butylate de potassium suivie de sa complexation avec son précurseur Ru(CO)₂(Cl)₂ en accord avec les procédures précédemment décrites.¹⁸³ Un rendement satisfaisant de 57% est obtenu. La structure cristallographique du complexe de **Ru-bpza** a été obtenue en cristallisant ce complexe dans une solution de méthanol par diffusion de vapeur avec de l'éther diéthylique (groupe d'espace C2/C) (**Figure II-7**).

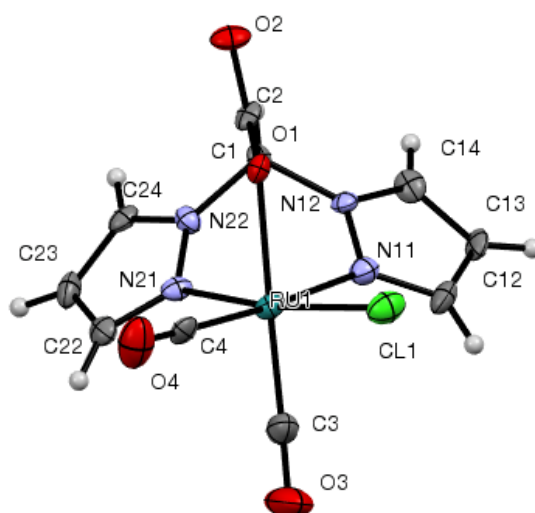


Figure II-7 : Structure cristallographique du complexe **Ru-bpza**.

L'ion métallique est situé dans un environnement octaédrique avec, dans le plan équatorial, deux atomes d'azote provenant des groupements pyrazoles, un atome de chlore et un atome de carbone provenant d'un groupement carbonyle et, dans le plan axial, un atome d'oxygène provenant du groupement carboxylate et un atome de carbone provenant d'un deuxième ligand carbonyle. Les distances des liaisons Ru-N sont légèrement différentes avec 2,073(7) Å pour N11 et 2,116(8) Å pour N21. Cette légère différence de réactivité est due à l'effet *trans* induit par l'appauvrissement en électrons de l'ion métallique par le ligand chloro. La distance

entre Ru-CO (C4) est légèrement plus longue que celle entre Ru-CO (C3) (1,941(3) Å et 1,877(1) Å, respectivement). La distance Ru-Cl est la plus longue avec 2,369(3) Å.

2-2-1-2. Spectroscopie infrarouge

Cette étude de spectroscopie infrarouge a été réalisée en milieu aqueux afin d'être proches des conditions réactionnelles de l'hybride **NikA/Ru-bpza** (tests catalytiques en milieu aqueux) (**Figure II-8**). Les spectres ATR-FITR du complexe **Ru-bpza** sous forme de poudre et dissous dans le tampon HEPES 10 mM pH 7 possèdent trois bandes de vibrations distinctes : une bande ν_{CO} à 1681 cm^{-1} correspondant à une vibration du carboxylate du ligand bpza et deux bandes de vibration ν_{CO} à 2007 et 2077 cm^{-1} correspondant aux deux ligands carbonyle. Il est important de remarquer que la dissolution du complexe dans le tampon HEPES 10 mM pH 7 n'entraîne pas l'échange des ligands CO avec le solvant.

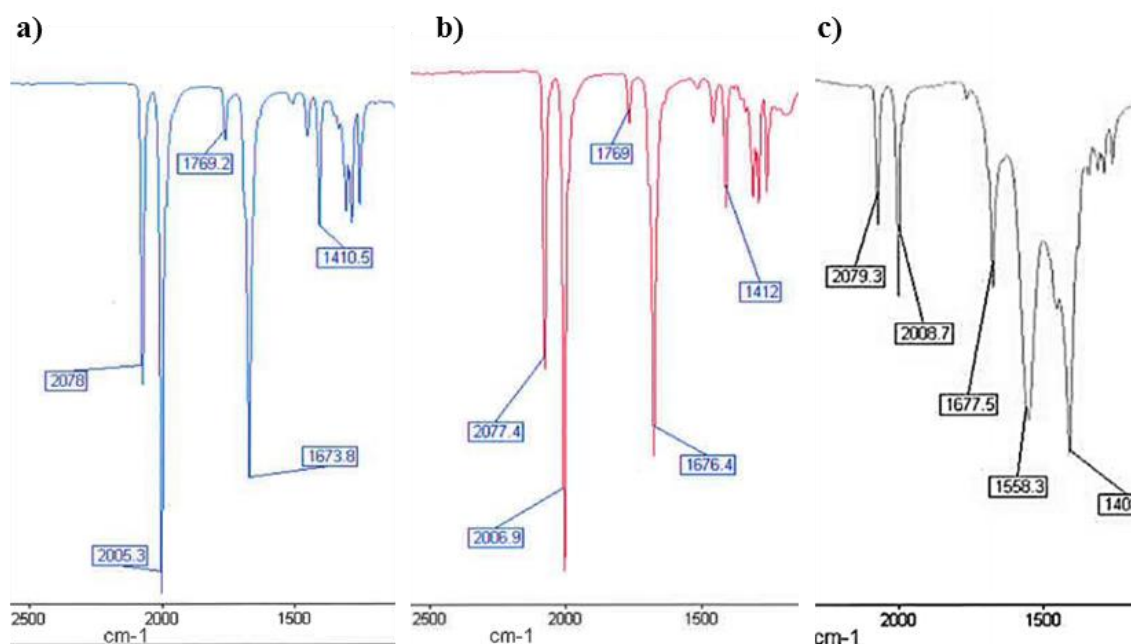


Figure II-8 : Spectres infrarouge ATR-FTIR du **Ru-bpza**. a) dans l'eau milli-Q, b) dans le tampon HEPES 10 mM pH 7 et c) dans le tampon acétate 40 mM pH 5,1.

2-2-1-3. Spectrométrie de masse

Afin de compléter les données structurales du complexe **Ru-bpza** en milieu aqueux, un spectre ESI-MS en mode positif a été réalisé sur le complexe dans H₂O. Ces données révèlent

la présence d'un fragment majoritaire à un m/z de 422,9 (100%) et plusieurs fragments minoritaires à un m/z de 406,9 (15%), 384,9 (8%) et 366,9 (6%) attribués à $[\text{Ru}(\text{bpza})(\text{CO})_2\text{Cl} + \text{K}^+]^+$, $[\text{Ru}(\text{bpza})(\text{CO})_2\text{Cl} + \text{Na}^+]^+$, à $[\text{Ru}(\text{bpza})(\text{CO})_2\text{Cl} + \text{H}^+]^+$ et à $[\text{Ru}(\text{bpza})(\text{CO})_2(\text{H}_2\text{O})]$, respectivement. Ces résultats concordent avec les résultats de spectroscopie infrarouge et permettent de suggérer que le complexe garde majoritairement la même structure en milieu aqueux. En revanche, il est intéressant de noter que le ligand chloro peut être échangé, en faible proportion, avec une molécule d' H_2O .

2-2-2. Synthèse et caractérisations de l'hybride NikA/Ru-bpza

2-2-2-1. Structure cristallographique de l'hybride

La structure cristallographique de l'hybride **NikA/Ru-bpza** a été résolue à 1,8 Å (**Figure II-9**). Cette structure montre l'ancrage du complexe **Ru-bpza** avec un taux d'occupation de 1. Ce complexe est lié dans NikA *via* différentes liaisons supramoléculaires. L'interaction la plus importante est la formation d'un pont salin entre le carboxylate du ligand et l'Arg137. La seconde interaction est la formation de liaisons d'atomes d'hydrogène entre la Tyr402, une molécule H_2O et le carboxylate du ligand.

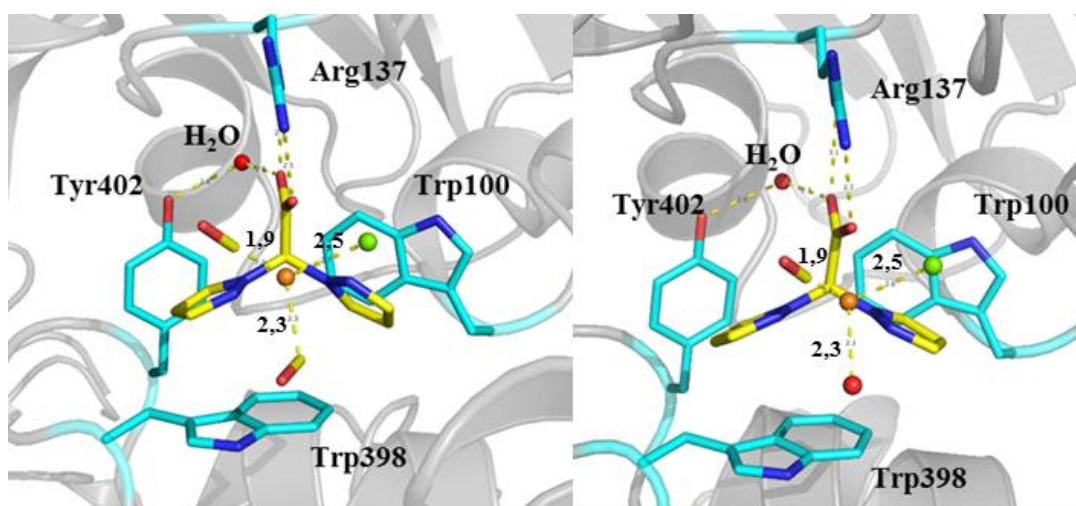


Figure II-9 : Structures cristallographiques de l'hybride **NikA/Ru-bpza**.

Contrairement au complexe **Ru-bpza** en solution, son ancrage au sein de la protéine entraîne un léger réarrangement du complexe. Dans toutes les structures de l'hybride **NikA/Ru-bpza**, l'ion métallique ruthénium est hexacoordiné par les deux atomes d'azote des groupements pyrazoles, l'atome d'oxygène du groupement carboxylate, l'atome de chlore, l'atome de

carbone du groupement carbonyle situé dans le plan apical. Concernant le sixième ligand, plusieurs structures ont conduit à des résultats différents. La densité électronique peut être modélisée soit par une molécule H₂O, soit par un ligand inconnu, soit par un groupement carbonyle. Ce groupement carbonyle présente un mode de liaison inhabituel avec une distance Ru-CO de 2,30 Å (au lieu de 1,9 Å) et un angle Ru-C-O qui dévie de 180° à 115°. Le ligand CO possède donc une labilité plus importante et pourrait donc être remplacé par une molécule de solvant.

2-2-2-2. Spectroscopie infrarouge

Pour appuyer ces résultats, une étude de spectroscopie infrarouge sur l'hybride **NikA/Ru-bpza** a été effectuée. Le spectre ATR-FTIR de l'hybride en solution, dans le tampon HEPES 10 mM pH 7, affiche deux bandes de vibrations intenses ν_{CO} à 2082 et 2017 cm⁻¹ et une autre bande plus faible à 2005 cm⁻¹ ce qui suggère la présence d'au moins deux espèces différentes contenant des ligands CO (**Figure II-10**).

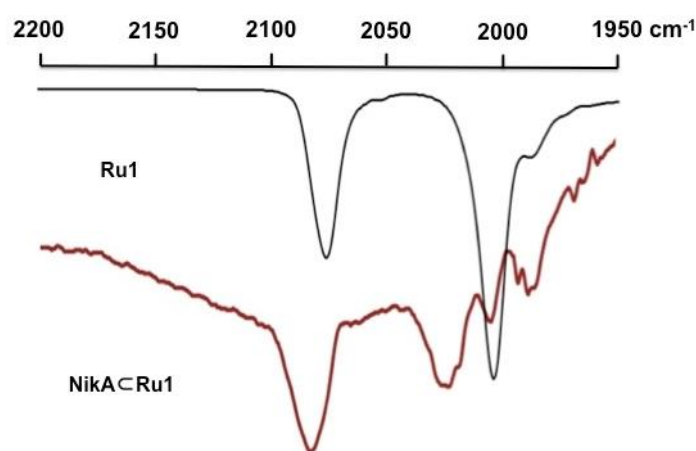


Figure II-10 : Spectres ATR-FTIR du complexe **Ru-bpza** (en noir) et de l'hybride **NikA/Ru-bpza** (en rouge) dans le tampon HEPES 10 mM pH 7.

Les vibrations à 2082 et 2005 cm⁻¹ sont équivalentes à celles observées pour le complexe en solution. En revanche, la variation du ratio d'intensité entre ces deux vibrations suggère la présence d'une seconde espèce ruthénium majoritaire possédant deux ligands carbonyles (2082 et 2017 cm⁻¹). La première espèce pourrait correspondre à un relargage partiel du complexe à l'extérieur de la protéine alors que la seconde espèce pourrait correspondre au complexe ancré au sein de la protéine.

La fixation du complexe au sein de la protéine entrainerait donc une modification des propriétés électroniques vibrationnelles. D'après la structure cristallographique, ce changement serait causé par un échange du ligand CO, en position *trans* du carboxylate, avec une molécule de solvant (H₂O).

2-2-2-3. Spectrométrie de masse

Pour compléter les résultats précédents, l'hybride **NikA/Ru-bpza** a été étudié par spectrométrie de masse (ESI-MS) en conditions natives (**Figure II-11**). Ces expériences ont été réalisées par le Dr. Elisabetta Boeri-Erba de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Sur le spectre, deux signaux distincts sont observés correspondant à l'apoprotéine et à l'holoprotéine.

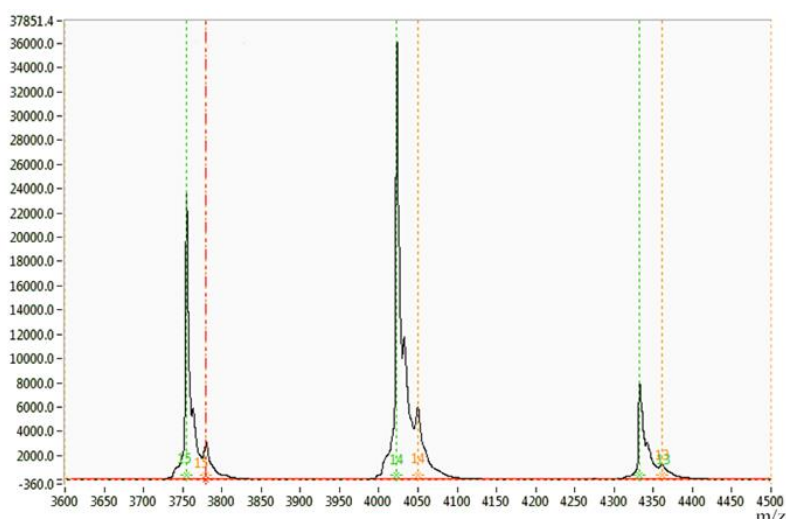


Figure II-11 : Spectres de masse ESI-MS de l'hybride **NikA/Ru-bpza** en conditions natives.

Ces pics ont un m/z compris entre 4023 et 4050 avec une charge de + 14. La différence de masse entre ces deux formes a été estimée à environ 385 en accord avec la présence du complexe de **Ru-bpza** initial (2 CO et 1 Cl).

2-2-2-4. Conclusion

Toutes les études de caractérisation mettent en avant de très grandes similitudes entre le complexe en solution et le complexe ancré au sein de la protéine. En revanche, une

caractéristique semble différer entre ces deux entités : la fixation du complexe au sein de la protéine semble entraîner un affaiblissement de la liaison Ru-CO en position *trans* du carboxylate ce qui pourrait avoir une grande incidence au niveau de l'activité catalytique de l'hybride.

2-3. Propriétés catalytiques

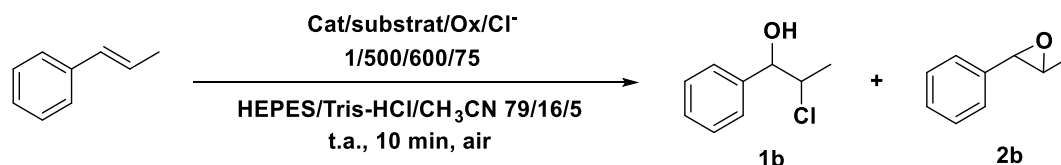
2-3-1. Premiers tests catalytiques avec l'hybride NikA/Ru-bpza.

Le complexe de **Ru-bpza** possède une réactivité en catalyse d'époxydation d'alcènes en présence d'iodosylbenzène en milieu organique (26 TON).¹⁸³ Suite à ces premiers résultats, les réactivités de l'hybride **NikA/Ru-bpza** et du complexe seul en solution ont été testées sur l'oxydation d'alcènes en milieu aqueux. Dans un premier temps, il a fallu définir le substrat et l'oxydant de la réaction. Le substrat de référence choisi est un dérivé du styrène, le *trans*- β -méthylstyrène, moins volatile que ce dernier. Concernant le choix de l'oxydant, plusieurs possibilités étaient envisagées : (i) PhIO (référence en milieu organique), (ii) son homologue, le diacétate d'iodobenzène (PIDA), plus soluble que PhIO, (iii) NaOCl, (iv) l'hydroperoxyde de *tert*-butyle et (v) du peroxyde d'hydrogène (plus « vert »). Pour le solvant, un mélange de tampons HEPES/tampon Tris-HCl/CH₃CN a été choisi avec un ratio de 79/16/5. Ce choix a été guidé par différents paramètres : une grande quantité de tampon HEPES 10 mM pH 7 pour maximiser la stabilité de la protéine, du tampon Tris-HCl 40 mM pH 7,5 qui est le tampon dans lequel la protéine est stockée et une faible quantité de CH₃CN qui permet une meilleure solubilisation des substrats organiques sans endommager la protéine. La quantité de tampon Tris-HCl doit être contrôlée avec précision. En effet, les ions chlorures présents dans le milieu réactionnel proviennent de ce tampon, il est donc nécessaire de minimiser la quantité de ce tampon pour éviter la réalisation de réactions parasites.

Les premières expériences de catalyse d'oxydation du *trans*- β -méthylstyrène sont réalisées à 37 μ M de catalyseur avec un ratio catalyseur/substrat/oxydant/chlore de 1/500/600/75 à température ambiante pendant 10 minutes (**Schéma II-5, Tableau II-4**).

Première remarque, hormis pour le NaOCl, la chlorhydrine est obtenue avec une chimiosélectivité de 100% et une régiosélectivité totale en faveur de la α -hydroxy- β -chloro chlorhydrine, suivant les règles de Markovnikov. Deuxième remarque, en présence de l'hybride **NikA/Ru-bpza**, PhIO est peu actif avec seulement 12% de rendement en **1b**

(**Entrée 1**). Cette faible réactivité provient très certainement de son manque de solubilité en milieu aqueux puisque son homologue, PIDA, atteint des rendements pratiquement quantitatifs (**Entrée 2**).



*Schéma II-5 : Catalyse d'oxydation du trans-β-méthylstyrène par différents oxydants en présence de l'hybride **NikA/Ru-bpza**.*

D'autres oxydants, comme l'hydroperoxyde de *tert*-butyle et le peroxyde d'hydrogène, se sont montrés inefficaces dans cette catalyse d'oxydation (**Entrées 4 et 5**) alors que le NaOCl possède une réactivité modérée avec la production de 20% de **1b** et de 7% de **2b**, l'époxyde correspondant (**Entrée 3**). Ces résultats démontrent que l'hybride **NikA/Ru-bpza** est nécessaire pour catalyser la réaction. En effet, en présence de la protéine seule, du complexe en solution ou en absence de catalyseur, de faibles rendements sont obtenus (<10 %, **entrée1**).

Tableau II-4 : Réactivités de l'hybride **NikA/Ru-bpza** avec différents oxydants.

<i>Entrée</i>	Oxydant	NikA/Ru-bpza 1b ^[b] / 2b (%)	NikA 1b ^[b] / 2b (%)	Ru-bpza ^[a] 1b ^[b] / 2b (%)	Sans catalyseur 1b ^[b] / 2b (%)
1	PhIO	12 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
2	PIDA	99 (81 ^[c]) / 0	9 / 0	3 / 0	9 (20 ^[c]) / 0
3	NaOCl	20 / 6	n.d.	n.d.	9 / 3
4	<i>t</i> -BuOOH	0 / 0	n.d.	n.d.	0 / 0
5	H ₂ O ₂	0 / 0	n.d.	n.d.	0 / 0

^[a] Des résultats similaires sont obtenus en présence de RuCl₃. ^[b] Rendements calculés à partir des 75 éq. de Cl⁻. ^[c] Rendements calculés à partir de 225 éq. de Cl⁻.

Fait intéressant, l'augmentation de la quantité de chlore de 75 à 225 équivalents (en ajoutant du tampon Tris-HCl plus concentré dans le milieu) permet d'atteindre 183 TON (**Entrée 2**). Cette dernière condition démontre la grande efficacité de l'hybride **NikA/Ru-bpza** avec un TOF de 18,3 min⁻¹. Ces valeurs surpassent celles obtenues avec le complexe de **Ru-bpza** en milieu organique (26 TON, 0,17 min⁻¹) ou même que l'hybride développé par Ward *et al.* à

base de streptavidine et d'osmium (27 TON, $0,17 \text{ min}^{-1}$ pour la formation de l'analogue diol). En revanche, en absence de catalyseur, les rendements atteignent 20%. Après la mise au point d'une réactivité d'hydroxychloration avec l'hybride **NikA/Ru-bpza**, l'étape suivante a été d'étendre la gamme de substrat dans les conditions 1/500/600/75 afin de minimiser la réaction non catalysée.

2-3-2. Expansion de la gamme de substrat

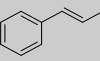
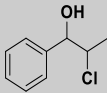
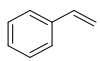
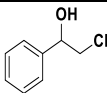
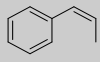
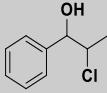
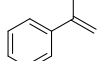
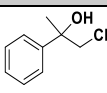
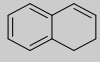
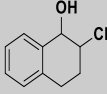
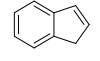
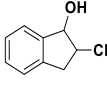
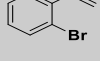
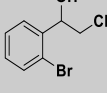
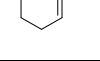
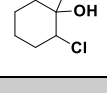
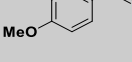
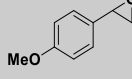
Pour la suite des expériences, les réactions de catalyse ont été réalisées en présence de $37 \mu\text{M}$ de catalyseur avec un ratio de 1/500/600/75 en catalyseur/substrat/oxydant/ Cl^- , en présence de PIDA comme oxydant, à température ambiante pendant 10 minutes. La réactivité a été étendue à d'autres alcènes. Les rendements obtenus en chlorhydrines ont été calculés par rapport à la quantité de chlore présente dans le milieu réactionnel (75 équivalents) alors que les rendements en époxydes ont été calculés par rapport à la quantité d'alcène (500 équivalents) (**Tableau II-5**).

Les rendements obtenus en chlorhydrines varient de 9% pour le 2-bromostyrène (**Entrée 7**) à plus de 50 % pour la majorité des substrats, à l'exception de l'indène et du méthylcyclohexène qui atteignent respectivement 39% et 28% (**Entrées 6 et 8**). Cependant, des résultats surprenants ont été obtenus sur la catalyse d'oxydation du 4-méthoxystyrène avec la formation de l'époxyde exclusivement avec un rendement maximal de 35% soit 175 TON (**Entrée 9**). Aucun des autres substrats testés n'a mené à la formation de l'époxyde. Ces résultats montrent que l'hybride **NikA/Ru-bpza** catalyse préférentiellement la conversion des doubles liaisons riches en électrons démontrant le caractère électrophile de l'addition. A noter que des substrats très appauvris en électrons comme le 4-bromostyrène ou trop insolubles comme le *cis*-stilbène, le *trans*-stilbène et le cinnamate de méthyle ou aliphatiques comme le *trans*-2-heptène n'ont pas du tout été convertis dans ces conditions réactionnelles.

Pour chacun des substrats, hormis le 4-méthoxystyrène, la même régiosélectivité en faveur de la α -hydroxy- β -chloro chlorhydrine est observée avec une chimiosélectivité de 100%. Le 4-méthoxystyrène possède aussi une chimiosélectivité totale mais en faveur de l'époxyde. Concernant la diastéréosélectivité, des valeurs modérées sont obtenues avec des ratios allant de 16,5:1 pour le 1,2-dihydronaphtalène à 1:2,6 pour le *cis*- β -méthylstyrène. Néanmoins, la

réaction est plutôt stéréosélective comme le montre la comparaison des rapports diastéréoisomériques entre le *trans*- β -méthylstyrène et le *cis*- β -méthylstyrène (**Entrées 1 et 3**).

Tableau II-5 : Expansion de la gamme de substrats.

Entrée	Substrat	Produit	Rendement (%) ^[a]	TON	<i>d.r.</i> ^[c]	<i>e.e.</i> ^[c] (%)
1			99	74	6,5 : 1	0
2			78	53	-	0
3			91	62	1 : 2,6	0
4			73	49	-	0
5			79	54	16,5 : 1	19
6			39	33	4,7 : 1	0
7			9	6	-	0
8			28	21	-	0
9			35 ^[b]	175	-	0

^[a] Conditions standard : 1/500/600/75 pour catalyseur/substrat/PIDA/Cl pour une concentration de 37 μ M pour l'hybride **NiA/Ru-bpza** sur une catalyse de 10 min. ^[b] Rendements calculés à partir des 500 éq. de substrat. ^[c] Calculés à partir des spectres obtenus en HPLC.

De plus, on remarque qu'avec l'utilisation d'un substrat plus rigide, comme le 1,2-dihydronaphtalène, un excès énantiomérique de 19 +/- 5 % peut être atteint. Ces résultats attestent que l'environnement protéique possède deux rôles majeurs dans la catalyse : l'activation du complexe de ruthénium lors de son ancrage au sein du site actif et le contrôle partiel du substrat induisant une certaine sélectivité.

2-3-3. Etude de la stabilité de la protéine vis-à-vis de PIDA

Dans un premier temps, la stabilité de la protéine en présence d'oxydant a été étudiée en spectrométrie de masse (conditions dénaturantes) (**Figure II-12**).

Tout d'abord, une première expérience de référence a été réalisée sur la protéine NikA en absence d'oxydant (**A**). Un fragment homogène unique est obtenu avec un m/z de 56 303. Ensuite, deux expériences en présence d'oxydant ont été réalisées en présence de 600 équivalents de PIDA (et en absence du substrat) après 5 et 15 minutes de réaction (**B** et **C**, respectivement). Dans les deux cas, un fragment hétérogène à 56 689 et 57 170 a été obtenu, respectivement. Ces valeurs correspondent aux multiples insertions d'atomes d'oxygène sur la protéine (maximum = 50 oxydations après 15 minutes sur un total de 502 acides aminés). On observe de plus un début de clivage de la protéine avec l'apparition d'un pic à 55 617 Da.

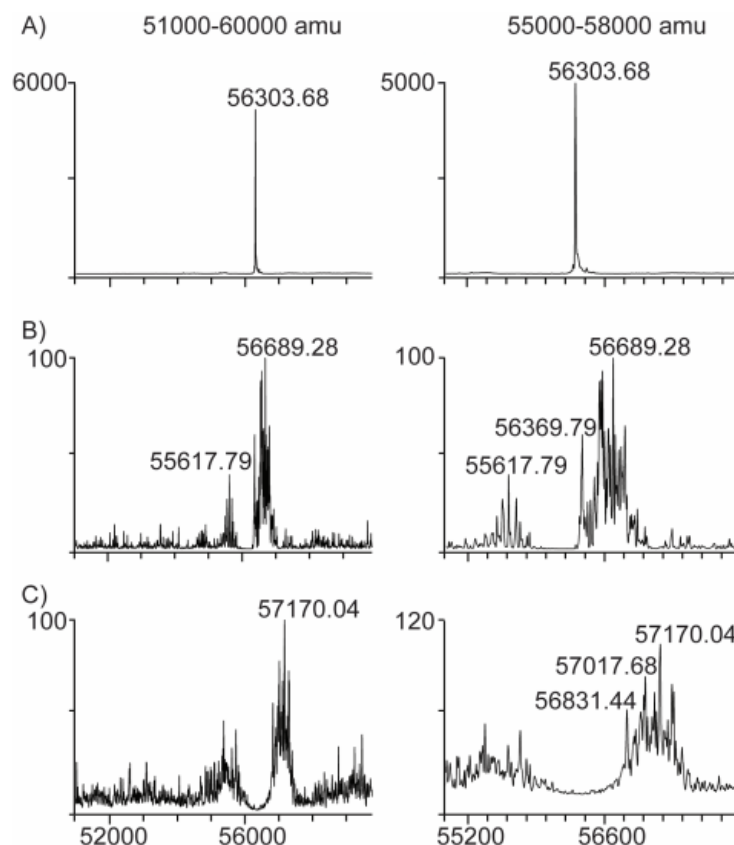


Figure II-12 : Spectres déconvolués de NikA qui a été analysée en conditions dénaturantes. **A)** NikA native. **B)** NikA mise en présence de PIDA pendant 5 min. **C)** NikA mise en présence de PIDA pendant 15 min.

Dans un second temps, pour évaluer l'impact de ces oxydations multiples sur la réactivité, la cinétique de l'hybride **NikA/Ru-bpza** en catalyse d'oxydation du *trans*- β -méthylstyrène en présence de PIDA et de chlore a été étudiée (**Figure II-13**). Sur 10 minutes de réaction, l'activité catalytique de l'hybride est linéaire ($7,4 \text{ min}^{-1}$) démontrant que ces oxydations sont probablement situées à l'extérieur de la cavité et n'ont donc aucune influence sur la réactivité de l'hybride.

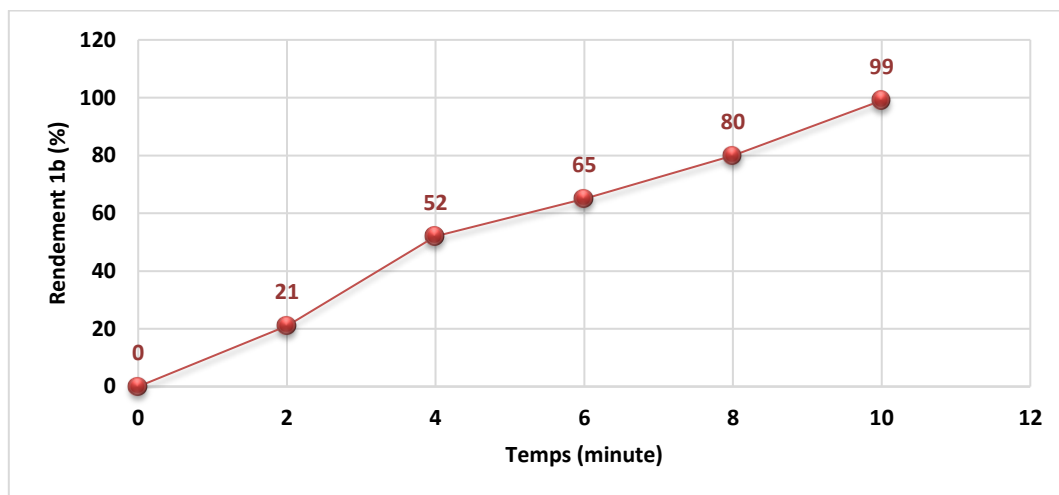


Figure II-13 : Cinétique de formation de **1b** avec **NikA/Ru-bpza**.

2-4. Mécanisme réactionnel

2-4-1. Addition électrophile


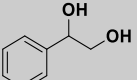
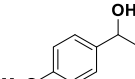
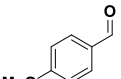
La production de α -hydroxy- β -chloro chlorhydrines correspond à une addition électrophile. Premièrement, l'hybride **NikA/Ru-bpza** réagit préférentiellement avec des alcènes possédant une double liaison riche en électrons (99% pour le *trans*- β -méthylstyrène contre 0% pour le 4-bromostyrène) révélant que l'espèce oxydante formée est donc électrophile. Deuxièmement, la différence de diastéréosélectivité observée entre les deux isomères *trans*- et *cis*- β -méthylstyrène démontre que le mécanisme réactionnel se fait en deux étapes successives induisant la formation d'un intermédiaire réactionnel. De plus, l'hypothèse d'une réaction radicalaire a été réfutée en réalisant une expérience de catalyse en présence d'un piègeur radicalaire, le DMPO. Aucune altération de l'activité catalytique de l'hybride n'a été observée suggérant le passage par un carbocation qui s'isomériserait partiellement.

2-4-2. Recherche des intermédiaires réactionnels

Des expériences complémentaires ont été entreprises afin de discriminer la nature de l'intermédiaire réactionnel. Cet intermédiaire pourrait être soit un adduit chloronium soit un époxyde compte tenu des résultats obtenus avec le 4-méthoxystyrène. Dans un premier temps, le comportement de chaque époxyde dérivé des alcènes testés a été étudié dans les conditions standard de catalyse (**Tableau II-6**). Lorsque la réaction de catalyse est réalisée avec l'hybride **NiA/Ru-bpza** sur l'oxyde du styrène, un nouveau produit réactionnel est obtenu, le 1-phényl-1,2-éthanediol, avec un rendement de 60% (**Entrée 1**) au contraire de la formation exclusive de la chlorhydrine lorsque le substrat est le styrène. Il est donc évident que la réactivité d'hydroxychloration ne résulte pas de la formation d'un intermédiaire époxyde libre.

Dans un deuxième temps, le comportement de la chlorhydrine du 4-méthoxystyrène a été évalué dans les mêmes conditions de catalyse afin de déterminer si celle-ci est un intermédiaire réactionnel dans la formation de l'époxyde correspondant. En présence d'hybride, cette catalyse d'oxydation amène à la formation du 4-méthoxybenzaldéhyde avec un rendement de 74% donc la chlorhydrine n'est pas un intermédiaire réactionnel pour former l'époxyde correspondant.

Tableau II-6 : Recherche des intermédiaires réactionnels.

Entrée	Substrat	Produit	Rendement (%) ^[a]	TON
1			60	300
2			74	370

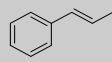
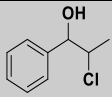
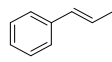
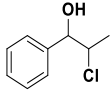
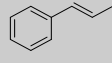
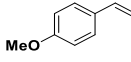
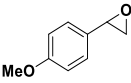
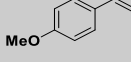
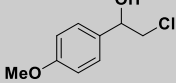
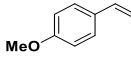
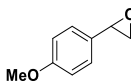

^[a] Conditions standard : 1/500/600/75 pour catalyseur/substrat/PIDA/Cl pour une concentration de 37 μ M pour l'hybride **NiA/Ru-bpza** sur une catalyse de 10 min dans un mélange de tampon HEPES/Tris-HCl/CH₃CN 79/16/5 (pH 7).

La légère production de chlorhydrines lors de la réaction non catalysée (**Tableau II-4, entrée 2**) pourrait être reliée à la formation d'une nouvelle espèce oxydante lors du mélange de PIDA et du tampon Tris-HCl. Une étude en RMN ¹H du mélange montre l'apparition lente d'une nouvelle espèce avec des déplacements chimiques de 7,20 (t), 7,43 (t) et 7,80 (d) ppm pour les

protons aromatiques. Ces valeurs sont identiques à celles obtenues pour l'oxydant PhICl₂, préparé séparément. Cet oxydant peut être formé lors d'une double substitution nucléophile des groupements acétates par les ions chlorures, présents dans la solution, et pourrait être catalysée par l'hybride. Le remplacement de PIDA par PhICl₂ dans une expérience de catalyse standard en présence d'hybride du *trans*-β-méthylstyrène conduit à des résultats de catalyse proches (**Tableau II-7**).

Les rendements et le rapport diastéréoisomérique sont légèrement plus faibles avec PhICl₂ avec 82% de rendement en chlorhydrine et un d.r. de 5 (**Entrées 1 et 2**). Ces résultats pourraient laisser penser que PhICl₂ est l'oxydant. Mais, lorsque le substrat est le 4-méthoxystyrène, une réactivité différente est observée en fonction de l'oxydant utilisé : avec PIDA, l'époxyde est obtenu avec un rendement de 36% alors qu'avec PhICl₂, la chlorhydrine est produite avec un rendement de 43% (**Entrées 4 et 5**). Ces résultats permettent de conclure que PhICl₂n'est pas l'espèce oxydante formée au cours de la réaction d'hydroxychloration catalysée par l'hybride **NikA/Ru-bpza**.

Tableau II-7 : Catalyses avec différents oxydants en présence de **NikA/Ru-bpza**.

<i>Entrée</i>	Substrat	Oxydant	Produit	Rendement (%)	<i>d.r.</i> ^[a]
1		PIDA/Cl ⁻		99 ^[b]	6,5 : 1
2		PhICl ₂		82 ^[b]	5 : 1
3		PhIO ₂	-	0	-
4		PIDA/Cl ⁻		36 ^[c]	-
5		PhICl ₂		43 ^[b]	-
6		PhIO ₂	 + 	15 ^[b] + 5 ^[b]	-

^{a]} Calculés à partir des spectres obtenus en HPLC. ^[b] Rendements calculés à rapport à Cl⁻. ^[c] Rendements calculés par rapport au substrat.

Dans la littérature, il existe une autre espèce oxydante issue du PIDA, le PhIO_2 . Cette réaction résulte de la dismutation du PIDA catalysée par le sel de ruthénium RuCl_3 afin de former du PhI et du PhIO_2 . Cette dernière espèce est très réactive et est capable d'oxyder de nombreux substrats tels que des alcanes ou des alcools.¹⁹⁸ Deux catalyses ont donc été réalisées en présence de RuCl_3 comme catalyseur et de PIDA comme oxydant. Dans le cas du *trans*- β -méthylstyrène, seules quelques traces de chlorhydrines ont été obtenues (**Entrée 3**). Pour le 4-méthoxystyrène, deux produits réactionnels sont formés, l'oxyde du 4-méthoxystyrène et le 4-méthoxybenzaldéhyde. Bien que l'époxyde soit obtenu, celui-ci atteint un rendement de 15% seulement (au lieu de 36% dans nos conditions standard) (**Entrée 6**). Ces expériences permettent d'affirmer que le PhIO_2 n'est pas produit au cours de nos expériences de catalyse.

Une dernière expérience de catalyse a été étudiée en faisant varier la concentration en substrat (*trans*- β -méthylstyrène et 4-méthoxystyrène) avec une concentration en chlore fixée à 75 équivalents (**Figure II-14**). Premièrement, seule la chlorhydrine a été détectée dans le cas du *trans*- β -méthylstyrène (100% de chimiosélectivité) mais avec une décroissance du nombre de TON de 74 à 26 lorsque la concentration en substrat diminue. A l'inverse, lorsque la concentration en 4-méthoxystyrène décroît, la chlorhydrine, non observée dans les conditions standard, apparaît. La chimiosélectivité en faveur de l'époxyde, qui était de 100% pour 500 équivalents de substrat, décroît à 44% pour 125 équivalents. Le changement de chimiosélectivité observé lorsque le ratio substrat/chlore varie suggère la présence d'une compétition entre le substrat et l'ion chlorure vis-à-vis d'une espèce oxydante commune.

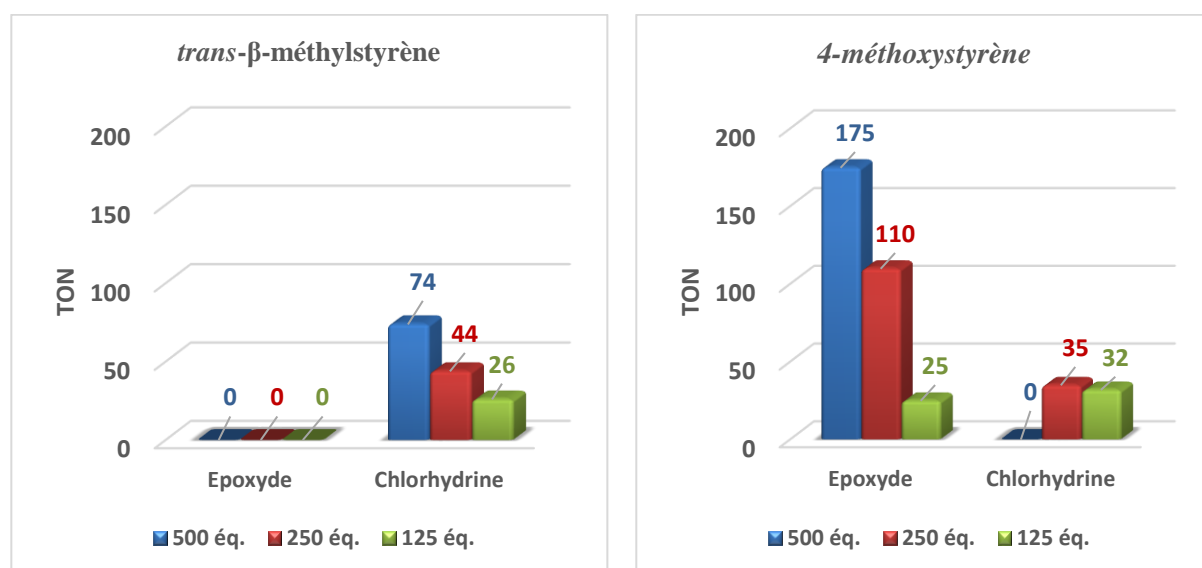


Figure II-14 : Etudes de compétition entre le substrat et le chlore.

Pour confirmer ces résultats, des études de compétition entre le *trans*- β -méthylstyrène et 4-méthoxystyrène ont été réalisées. Pour cela, 500 équivalents de chaque substrat sont mis en solution en présence d'un défaut d'oxydant (600 équivalents) et d'un défaut de chlore (75 équivalents). On observe alors que les rendements en oxyde du 4-méthoxystyrène sont proches (32% vs 35% dans les conditions standard) alors que les rendements en **1b** sont largement diminués (4% vs 99% dans les conditions standard). L'affectation des rendements lors de l'étude de compétition semble donc indiquer le passage par une espèce oxydante commune qui réagit préférentiellement avec des substrats enrichis en électrons.

2-4-3. Recherche de l'espèce oxydante

Précédemment, les différentes études de caractérisation de l'hybride et du complexe en solution ont permis de montrer l'influence de l'échafaudage protéique sur le complexe. Ces études ont mis en avant la forte labilité du ligand CO situé en *trans* du groupement carboxylate, caractéristique primordiale pour l'activation de l'oxydant. Nous nous sommes donc intéressés au rôle du centre métallique dans l'activation de l'oxydant. Ce centre métallique peut soit jouer le rôle d'acide de Lewis soit réaliser une réaction de type rédox. Pour cela, deux expériences de catalyse en présence du complexe **Mg-EDTA** à la place du complexe de **Ru-bpza** ont été réalisées sur le *trans*- β -méthylstyrène et le 4-méthoxystyrène. Ce complexe a été choisi pour la capacité du ligand EDTA à se fixer au sein de la protéine NikA et pour le rôle du magnésium, qui est généralement un très bon acide de Lewis mais qui n'est pas capable de faire des processus rédox. Lors de cette catalyse dans les conditions standard, aucune réactivité n'a été observée appuyant l'hypothèse d'une réaction rédox.

La première étape serait l'activation de l'oxydant par substitution nucléophile d'un des groupements acétate de PIDA par la molécule d'eau liée au complexe de ruthénium. Un premier intermédiaire réactionnel serait alors formé Ru(II)-O(H)-I-PhX (avec X = H₂O ou OAc) (**A**) qui évoluerait vers une espèce de type Ru(II)-O=IPh (**B**) (**Figure II-15**).

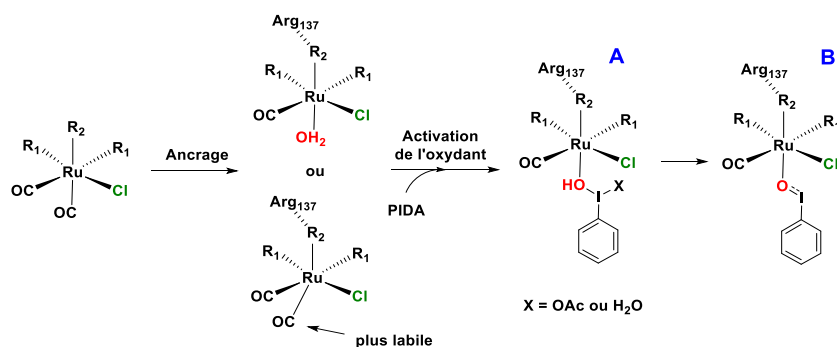


Figure II-15 : Mécanisme plausible d'activation de l'oxydant par l'hybride *Nika/Ru-bpza*.

L'intermédiaire B est connu pour former par coupure hétérolytique un Ru(IV)=O (C).¹⁹⁹⁻²⁰¹ Il est admis aujourd'hui que cette espèce est capable de former des époxydes. La formation de l'oxyde du 4-méthoxystyrène résulterait donc de l'attaque nucléophile de la double liaison de l'alcène sur le Ru-oxo formé conduisant à l'intermédiaire D (**Figure II-16**).

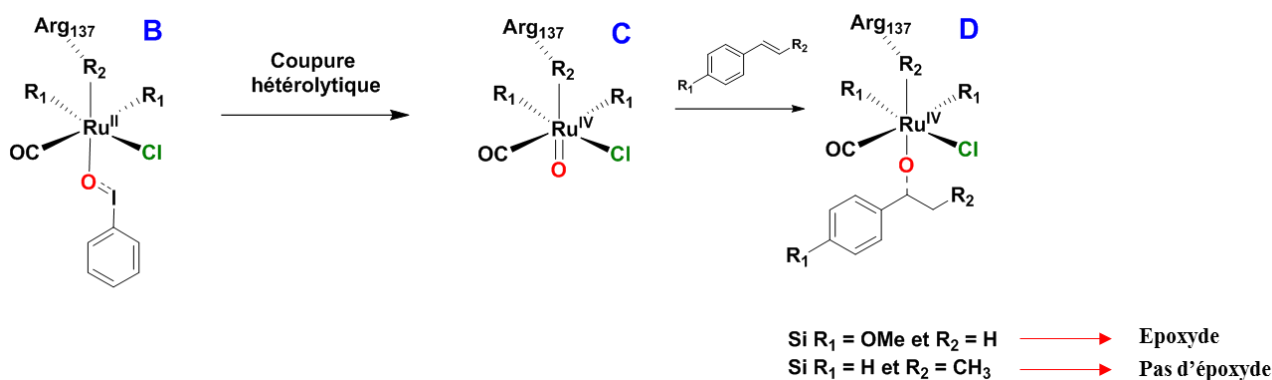


Figure II-16 : Mécanisme proposé pour la formation de l'époxyde du 4-méthoxystyrène par l'hybride *Nika/Ru-bpza*.

Une autre alternative propose une addition électrophile de l'iode hypervalent, une fois activé par le métal, sur la double liaison de l'alcène.²⁰² Cette hypothèse est réfutée puisque les rendements et les sélectivités obtenus avec PhICl_2 sont différents des conditions standard avec la formation de la chlorhydrine du 4-méthoxystyrène plutôt que l'époxyde.

Concernant la formation des chlorhydrines, trois voies catalytiques peuvent être proposées : (i) un ion chlorure, présent dans le milieu, pourrait substituer le groupement X (OAc ou H_2O) de l'intermédiaire A pour former l'intermédiaire E, (ii) l'intermédiaire C réagirait avec un ion chlorure pour former une espèce de type Ru-OCl (F), (iii) la double liaison de l'alcène réagirait directement avec le Ru(IV)=O (C) pour former l'intermédiaire D qui serait ensuite

attaqué en position β par un ion chlorure, soit présent dans le milieu, soit présent sur le complexe (**Figure II-17**).

La première hypothèse est présentée par analogie avec les vanadium haloperoxydases,²⁰³ où l'oxydation à deux électrons de l'ion chlorure serait centrée sur l'atome d'iode, comme dans le cas du PhICl_2 , permettant la formation d'un adduit chloronium en présence de l'alcène (**E**). Or, les réactivités et sélectivités étant différentes de celles avec le PhICl_2 , notamment dans le cas de la réactivité avec le 4-méthoxystyrène, cette hypothèse n'est pas retenue.

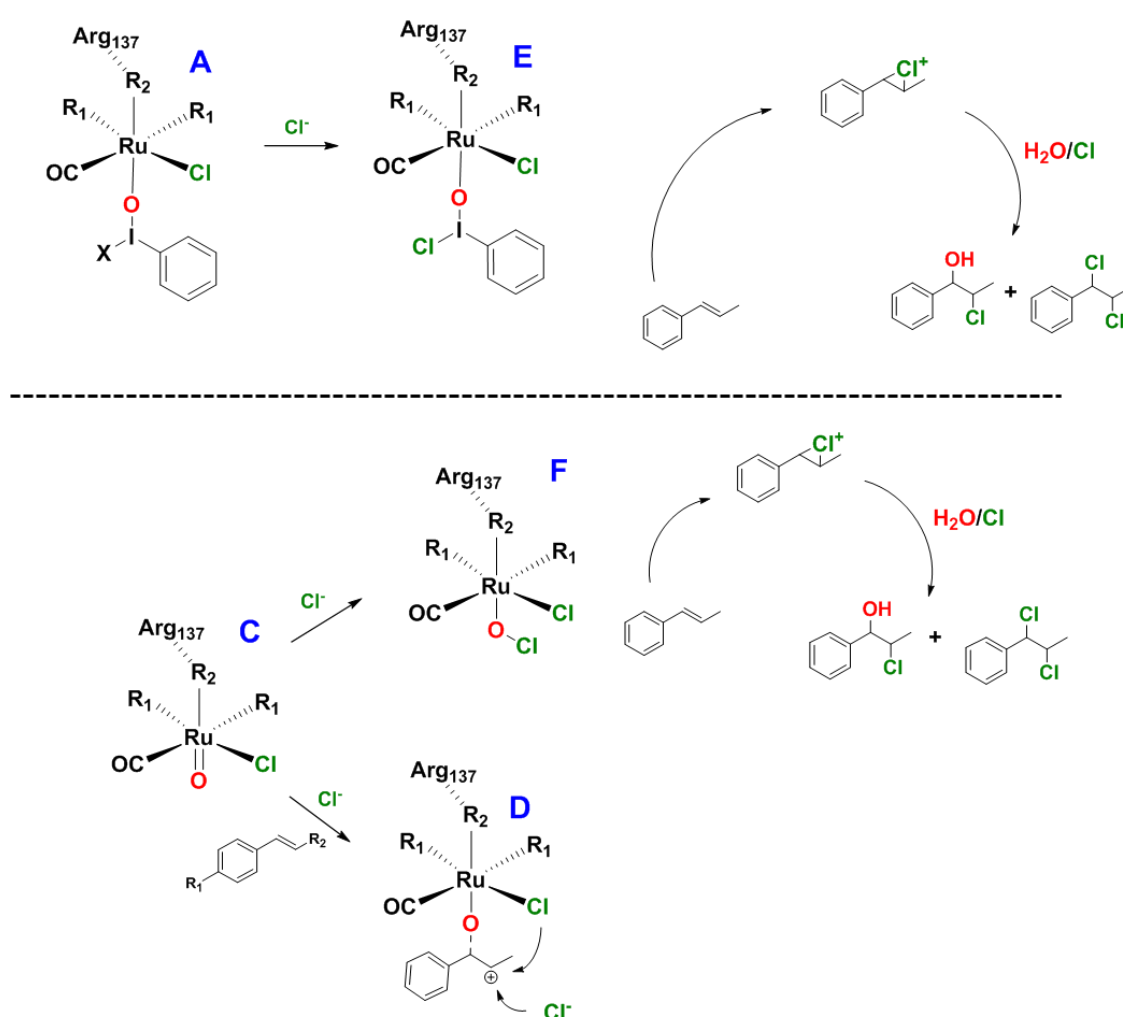


Figure II-17 : Mécanismes proposés pour la formation des chlorhydrines par l'hybride *NikA/Ru-bpza*.

Le deuxième chemin réactionnel proposé serait la formation d'un intermédiaire de type Ru-OCl (**F**) formé à partir de l'oxydation d'un ion chlorure par l'intermédiaire Ru(IV)=O (**C**). En

effet, de nombreuses études évoquent la génération d'espèce de type OCl pour la formation de chlorhydrines à partir d'alcènes.²⁰⁴⁻²⁰⁶ Des études de catalyse d'oxydation du *trans*- β -méthylstyrène ont donc été réalisées en utilisant NaOCl comme oxydant avec un ratio catalyseur/substrat/oxydant/Cl⁻ de 1/500/600/600. En présence d'hybride **Nika/Ru-bpza**, deux produits réactionnels sont obtenus : la chlorhydrine avec un rendement de 20% (100 TON) et l'époxyde avec un rendement de 7% (35 TON). En comparaison, dans les catalyses standard, uniquement la chlorhydrine est obtenue avec un rendement de 61% (305 TON). Ces différences de réactivité montrent que le passage par une espèce de type Ru-OCl n'est certainement pas une solution viable.

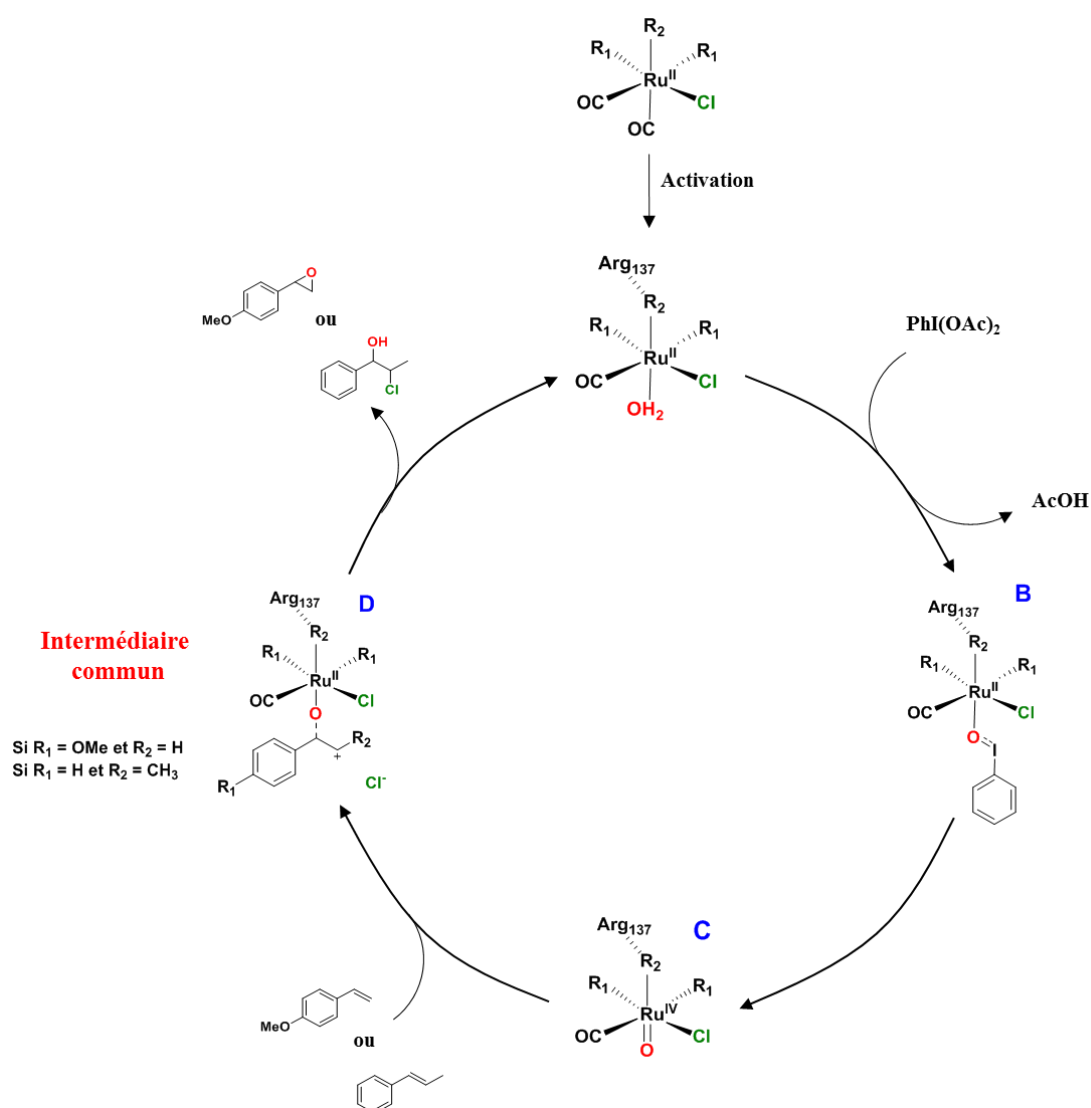


Figure II-18 : Mécanisme réactionnel global proposé pour la catalyse d'oxydation par **Nika/Ru-bpza**.

Les études de compétition réalisées ont permis de démontrer que les deux produits d'oxydation découlaient d'une espèce oxydante commune. Dans ce cadre, l'intermédiaire **D** semble être une possibilité intéressante. En effet, la présence de cette espèce permettrait soit de former l'époxyde, si l'alcène est enrichi en électrons, soit de former la chlorhydrine, par une attaque d'un ion chlorure présent dans le milieu réactionnel ou lié au ruthénium. Pour valider cette dernière hypothèse, des calculs théoriques sont en cours, au sein du laboratoire, avec S. Crouzy de l'équipe MCT. Les résultats préliminaires obtenus semblent être en accord avec l'hypothèse proposée. Suite à ces résultats, la **Figure II-18** résume le mécanisme global proposé.

2-5. Conclusion

Une nouvelle métalloenzyme artificielle **NikA/Ru-bpza** a été conçue pour la production de chlorhydrines et d'époxydes à partir d'alcènes en présence d'un iode hypervalent et d'une source de chlore. Cette catalyse, basée sur l'activation de l'oxydant par le métal, est assez inhabituelle et représente un nouvel exemple intéressant de l'intérêt d'utiliser la bio-inspiration pour développer de nouvelles méthodologies de synthèses plus sûres et compétitives avec la biocatalyse (305 TON, 31 min⁻¹). Cet hybride possède la particularité de pouvoir réaliser deux réactivités différentes, hydroxychloration et époxydation, en fonction de la nucléophilie de la double liaison de l'alcène. Ainsi, des substrats fortement enrichis en électrons, comme le 4-méthoxystyrène, sont transformés en époxyde avec une excellente chimiosélectivité et des substrats moins enrichis en électrons, sont transformés en chlorhydrines avec d'excellentes chimio- et régiosélectivités. Cette étude a permis de mettre en avant le rôle de la protéine dans cette catalyse d'oxydation. Son premier rôle est l'activation du complexe lors de l'ancrage de celui-ci au sein du site actif. De plus, l'ancrage lui confère une réactivité non naturelle que le complexe seul ne possède pas. Cela induit une labilité plus importante du ligand CO, nécessaire pour l'activation de l'oxydant par le complexe. Son deuxième rôle est le contrôle des différentes sélectivités de la réaction comme l'illustre les hautes valeurs de rapports diastéréoisomériques et l'excès énantiomérique obtenu dans le cas du 1,2-dihydronaphtalène (20 % *ee*). Son troisième rôle consiste en la stabilisation du complexe qui est largement améliorée au sein de la cavité. Cette incorporation permet une protection accrue du complexe vis à vis de l'oxydation et de la dégradation et, à la fois, de développer des réactions non naturelles. Cela justifie, une fois de plus, l'utilisation de ces

hybrides en catalyse d'oxydation. Le mécanisme réactionnel reste ouvert et des calculs théoriques approfondis sont en cours.

Références

184. G. F. Tojo, M., *Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones*, Ed. Springer, New York, 2006.
185. R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, G.-J. ten Brink and A. Dijkman, *Accounts of Chemical Research*, 2002, **35**, 774-781.
186. J. M. Hoover and S. S. Stahl, *Journal of the American Chemical Society*, 2011, **133**, 16901-16910.
187. J. E. Steves, Y. Preger, J. R. Martinelli, C. J. Welch, T. W. Root, J. M. Hawkins and S. S. Stahl, *Organic Process Research & Development*, 2015, **19**, 1548-1553.
188. M. Carbó López, Thèse de l'Université Joseph Fourier 2014.
189. M. Carbó López, P. Y. Chavant, F. Molton, G. Royal and V. Blandin, *ChemistrySelect*, 2017, **2**, 443-450.
190. J. M. Hoover, B. L. Ryland and S. S. Stahl, *ACS Catalysis*, 2013, **3**, 2599-2605.
191. J. E. Bäckvall, *Modern oxidation Methods*, Wiley-VCH, J. E. Bäckvall edn., 2010.
192. A. Podgoršek, M. Zupan and J. Iskra, *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, **48**, 8424-8450.
193. A. Castellanos and S. P. Fletcher, *Chemistry – A European Journal*, 2011, **17**, 5766-5776.
194. T. A. Nijhuis, M. Makkee, J. A. Moulijn and B. M. Weckhuysen, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2006, **45**, 3447-3459.
195. A. El-Qisairi and P. M. Henry, *Journal of Organometallic Chemistry*, 2000, **603**, 50-60.
196. V. Köhler, J. Mao, T. Heinisch, A. Pordea, A. Sardo, Y. M. Wilson, L. Knörr, M. Creus, J.-C. Prost, T. Schirmer and T. R. Ward, *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, **50**, 10863-10866.
197. G. Tuerkoglu, S. Tampier, F. Strinitz, F. W. Heinemann, E. Huebner and N. Burzlaff, *Organometallics*, 2012, **31**, 2166-2174.
198. M. S. Yusubov, K.-W. Chi, J. Y. Park, R. Karimov and V. V. Zhdankin, *Tetrahedron Letters*, 2006, **47**, 6305-6308.
199. H. Nishiyama and Y. Motoyama, *Chemical Communications*, 1997, DOI: 10.1039/A705109C, 1863-1864.
200. G. A. Barf and R. A. Sheldon, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 1995, **102**, 23-39.
201. T. Ishizuka, H. Kotani and T. Kojima, *Dalton Transactions*, 2016, **45**, 16727-16750.
202. A. Nasrallah, G. Grelier, M. I. Lapuh, F. J. Duran, B. Darses and P. Dauban, *European Journal of Organic Chemistry*, 2018, **0**.
203. G. J. Colpas, B. J. Hamstra, J. W. Kampf and V. L. Pecoraro, *Journal of the American Chemical Society*, 1996, **118**, 3469-3478.
204. P. Swamy, M. A. Kumar, M. M. Reddy, M. Naresh, K. Srujana and N. Narender, *RSC Advances*, 2014, **4**, 26288-26294.
205. W. Hans-Achim and W. Wolf-Dietrich, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1997, **36**, 390-392.
206. F. H. Vaillancourt, E. Yeh, D. A. Vosburg, S. Garneau-Tsodikova and C. T. Walsh, *Chemical Reviews*, 2006, **106**, 3364-3378.

Chapitre III

Chapitre III : Développement d'une biocatalyse hétérogène

1. Introduction

A ce jour, trois métalloenzymes artificielles à base de la protéine NikA ont été développées pour des réactions d'oxydations.^{11, 114, 207} Cependant, malgré une bonne activité catalytique, leurs performances sont limitées par le manque de stabilité des hybrides vis-à-vis des solvants organiques (solubilité des substrats), des oxydants utilisés, du pH (acide ou basique) ou de la température. Dans ce cadre, le développement d'une biocatalyse hétérogène combinant les avantages des métalloenzymes artificielles et de la catalyse hétérogène semble être une solution intéressante.

Les bénéfices de la réticulation des cristaux d'enzymes par la technologie CLEC sont assez divers : une amélioration des activités catalytiques (très haute concentration en catalyseur localisée) et des sélectivités, une stabilité accrue et une diffusion aisée des réactifs et produits (présence de canaux de solvants, **Figure III-1**). De plus, les progrès récents des techniques de cristallisation et la reproductibilité des conditions de cristallisation de la protéine NikA représentent un atout considérable pour développer ce projet.

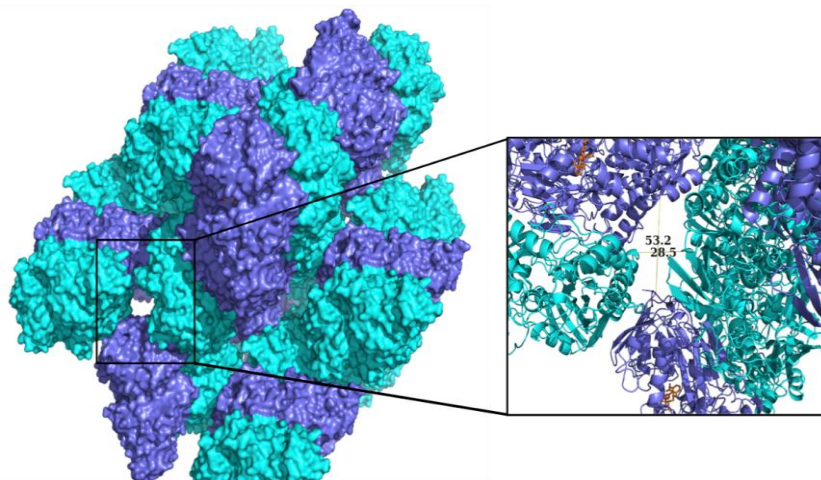


Figure III-1 : Réseau cristallin de NikA. Les molécules A et B dans l'unité asymétrique sont en cyan et bleu, respectivement. Les distances sont en Angströms.

Chapitre III : Développement d'une biocatalyse hétérogène

Ce projet repose donc sur le développement d'une catalyse hétérogène utilisant des cristaux de métalloenzymes artificielles réticulés. Les objectifs sont de : (i) mettre en place la technologie CLEC sur les cristaux de la protéine NikA, (ii) développer une biocatalyse hétérogène sur différentes réactions d'oxydation, (iii) déterminer les mécanismes réactionnels mis en jeu.

Dans ce chapitre, dans un premier temps, je vous présenterai la synthèse de deux nouveaux hybrides (**NikA/Fe-L2** et **NikA/Fe-LIII**) (**Schéma III-1, b**). Ensuite, je vous illustrerai la mise en place de la technologie CLEC sur les cristaux des nouveaux hybrides synthétisés. Dans un troisième temps, je présenterai les différentes caractérisations des CLEC obtenus. Puis, je développerai trois nouvelles réactivités d'oxydation avec ces métalloenzymes artificielles hétérogènes :

- (i) la sulfoxydation de thioéthers en présence de NaOCl,
- (ii) l'hydroxychloration d'alcènes en présence d'Oxone® et de NaCl,
- (iii) la coupure oxydante d'alcènes en présence du couple O₂/DTT.

Pour chacune des réactivités, les nouveaux hybrides seront comparés aux hybrides de référence (**NikA/Fe-L0**, **NikA/Fe-L1** et **NikA/Fe-LII**) (**Schéma III-1, a**).

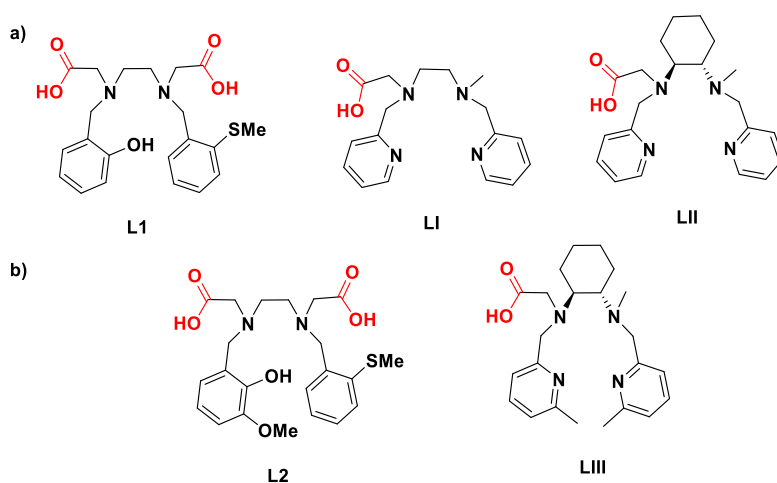


Schéma III-1 : a) Ligands référence L1, LII et LIII. b) Nouveaux ligands L2 et LIII.

2. Préparation et caractérisation des cristaux NikA/Fe-Lx

2-1. Contexte

Au laboratoire, deux familles de complexes sont principalement utilisées : les complexes de la famille **Fe-Ox**, dont les études portent sur l'activation d'O₂, et les complexes de la famille **Fe-N₂Py₂**, dont les études portent sur la synthèse de sulfoxydes énantiopurs.

Concernant la famille **Fe-Ox**, l'étude réalisée par cristallographie en temps résolu sur des cristaux de **NikA/Fe-L0** a permis de mettre en évidence la capacité de l'hybride à activer O₂ pour réaliser la dihydroxylation aromatique intramoléculaire du ligand benzyle.¹¹⁴ La formation du catéchol correspondant conduit à la saturation de la sphère de coordination du fer et stoppe l'activité catalytique (2 TON). Dans ce cadre, un nouveau ligand avait été synthétisé (L1) en bloquant stratégiquement la position α du ligand benzyle par un groupement thioéther afin d'éviter l'hydroxylation aromatique.²⁰⁸ Des résultats préliminaires ont été obtenus en cristallographie sur les hybrides **NikA/Fe-L1** (**Figure III-2**).

Lors de leur utilisation dans les réactions de photocatalyse (Thèse de Laurianne Rondot), les hybrides **NikA/Fe-L1** présentaient une période d'induction longue d'environ 19 h pour l'oxydation d'un substrat exogène, période liée à l'activation du complexe par l'hydroxylation aromatique intramoléculaire.²⁰⁸ Lors de mon arrivée au laboratoire, le nouveau ligand L2 a donc été synthétisé pour s'affranchir de cette étape. Celui-ci possède un groupement phénolate déjà activé avec la présence d'un groupement méthoxyle en position α afin d'empêcher toute oxydation intramoléculaire du ligand (**Schéma III-1, b**).

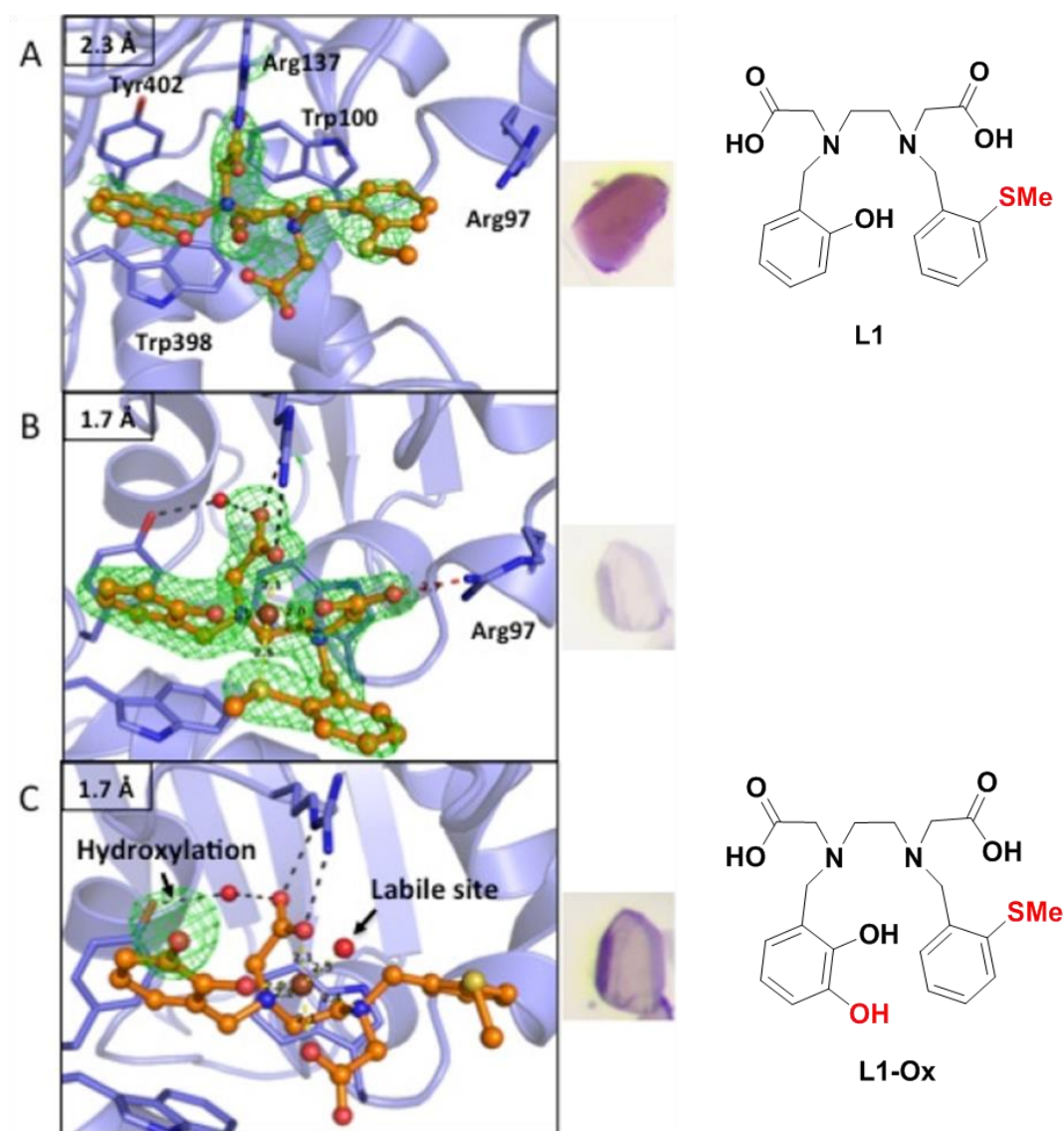


Figure III-2 : Structures cristallographiques de l'hybride *NikA/Fe-L1*. **A**) à l'état initial, **B**) après réduction en boîte à gants en présence de DTT, **C**) en présence d'O₂ après l'étape de réduction.

Concernant la famille **Fe-N₂Py₂**, une étude avait été réalisée en 2012 par Cavazza *et al.*²⁰⁹ L'objectif de cette étude était de développer une série d'hybrides à base des complexes mononucléaires de **Fe-LI** et **Fe-LII** mimant le site actif des oxygénases à fer non hémique pour la sulfoxydation de thioéthers. (**Schéma III-1, a**). Cependant, ces deux complexes étaient synthétisés sous un mélange de topologies.²¹⁰ Les hybrides **NikA/Fe-LI** et **NikA/Fe-LII** ont été caractérisés en solution et leur ancrage au sein de la protéine NikA a été étudié par des expériences de fluorescence et de diffraction aux rayons X. Les structures cristallographiques des hybrides **NikA/Fe-LI** et **NikA/Fe-LII** ont été résolues et ont révélé un mélange de complexes sous différentes topologies au sein de NikA, dans les deux molécules

A et B constituant l'unité asymétrique. Pour illustration, de façon inattendue et non expliquée encore à ce jour, il avait été observé dans le cas de l'hybride **NikA/Fe-LII**, qu'au sein de chaque molécule A, un complexe de topologie *cis-β* était fixé alors que dans, chaque molécule B un complexe de topologie *trans* était présent (**Figure III-3**).

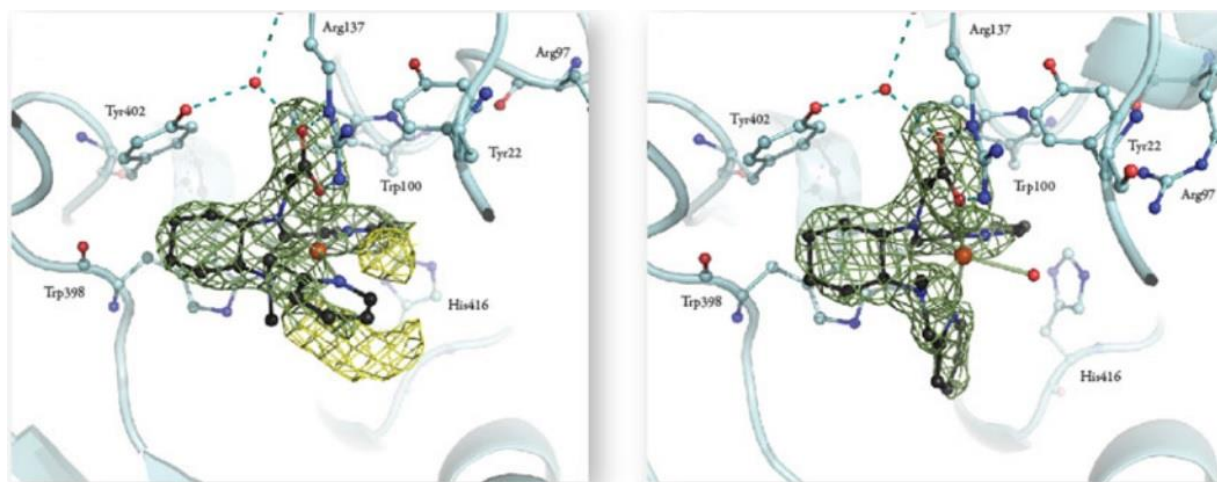


Figure III-3 : Structures cristallographiques de l'hybride **NikA/Fe-LII**. Les deux molécules A (à gauche, **Fe-LII cis-β**) et B (à droite, **Fe-LII trans**) de l'unité asymétrique sont présentées.

Afin de s'affranchir de l'effet potentiellement négatif de cette double conformation, la synthèse d'un nouveau ligand LIII a été envisagée au cours de ma thèse (**Schéma III-1, b**). Les deux groupements méthyle situés en position *ortho* de la pyridine créeraient un encombrement stérique assez important permettant d'obtenir une topologie unique pour le complexe **Fe-LIII**.

2-2. Synthèse des ligands

2-2-1. Synthèse du ligand L2

La synthèse du ligand L2 se déroule en quatre étapes.

Etape 1

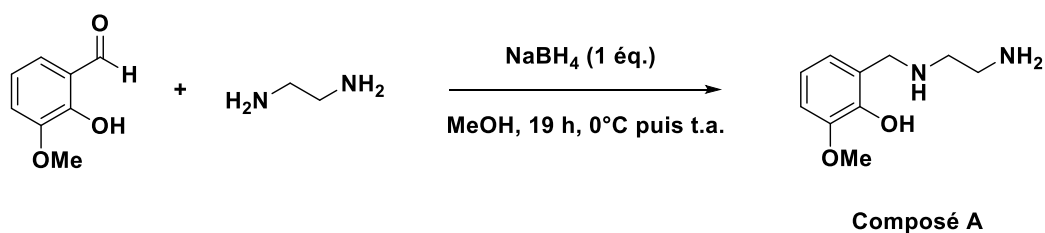


Schéma III-2.

La première étape de la synthèse consiste à condenser de l'éthylène diamine sur l'ortho-vanilline (**Schéma III-2**). La difficulté de cette étape est de réaliser uniquement la monoaddition et d'éviter la formation d'un produit secondaire disubstitué. Pour cela, la réaction est réalisée à 0°C, en milieu dilué et avec un large excès d'éthylène diamine (5 équivalents). Un bon rendement de 75% est obtenu pour le composé **A** et l'éthylène diamine en excès a pu être éliminée par l'intermédiaire de plusieurs lavages avec une solution de NaCl saturée. Aucune étape de purification n'a donc été nécessaire.

Etape 2

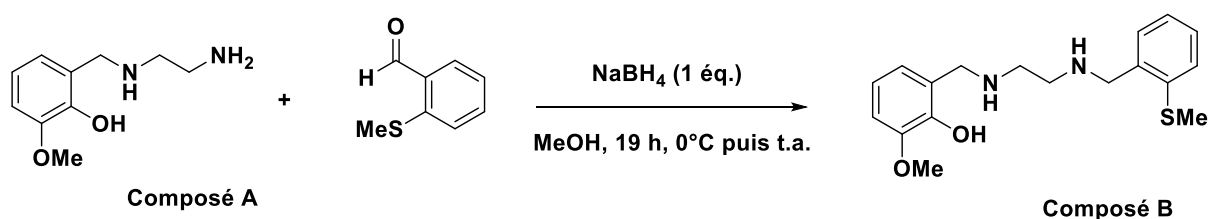


Schéma III-3.

Pour la deuxième étape, le but est d'introduire le ligand benzyle modifié. Pour cela, l'aldéhyde salicylique utilisé pour la synthèse de L0 a été remplacé par du 2-(méthylthio)benzaldéhyde (**Schéma III-3**). L'amine primaire étant plus réactive que l'amine secondaire, cette étape pose moins de problème de polyalkylation. L'aldéhyde est donc mis en présence d'un seul équivalent d'amine (au lieu de 5 équivalents pour l'étape précédente). Le composé **B** est obtenu avec un très bon rendement de 95% et aucune étape de purification n'est nécessaire.

Etape 3

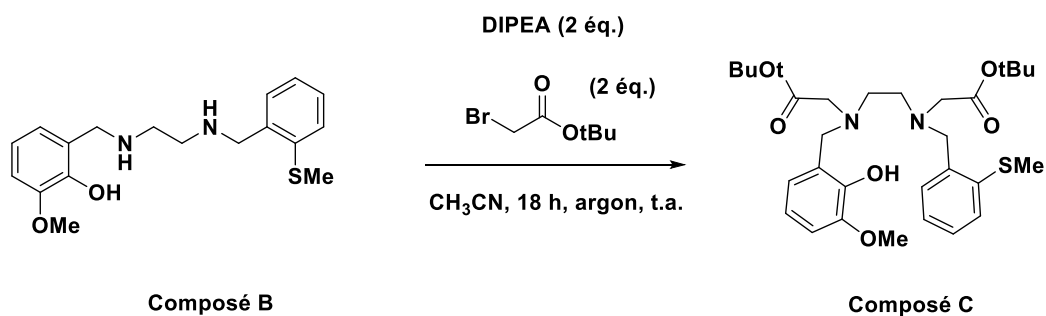


Schéma III-4.

La troisième étape de cette synthèse a pour but d'insérer les groupements carboxyle permettant l'ancrage au sein de la protéine NikA. En revanche, pour éviter les problèmes de purification liés aux composés comportant à la fois des fonctions amines et carboxyliques, il a été nécessaire de les introduire sous leur forme protégée ester. Pour cela, une substitution nucléophile du brome du bromoacétate de *tert*-butyle est réalisée afin d'obtenir le composé C (Schéma III-4). Le choix de la base est primordial. En effet, elle permet de piéger le sous-produit formé, l'acide bromhydrique, qui sinon forme un sel d'ammonium avec la molécule B, qui elle-même ne peut plus jouer son rôle de nucléophile. Dans des travaux précédents, de nombreuses bases ont été testées pour optimiser cette étape réactionnelle : le carbonate de potassium, la triéthylamine, la DIPEA ou encore le DBU. Parmi ces différentes bases, la réaction avec DIPEA s'est avérée la plus efficace même si des rendements modérés sont obtenus (53%).

Etape 4

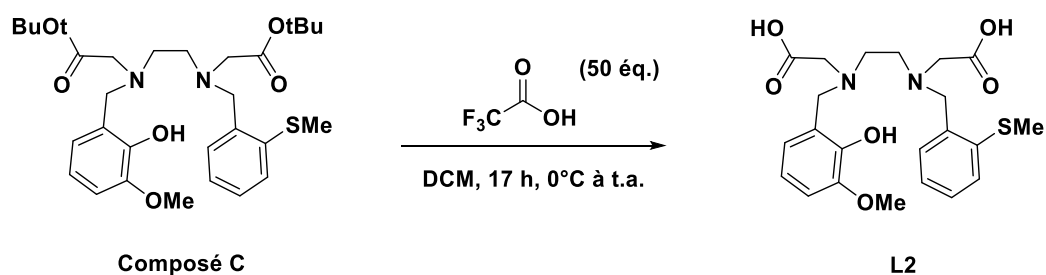


Schéma III-5.

La dernière étape est la déprotection des acides carboxyliques par une solution d'acide trifluoroacétique à 50% dans le DCM (Schéma III-5). La difficulté de cette étape réside dans l'élimination totale de l'acide trifluoroacétique à la fin de la réaction. Une fois la réaction

terminée, une précipitation dans l'éther permet l'obtention du ligand L2 avec un très bon rendement de 93%. Un rendement global intéressant de 35% sur quatre étapes de synthèse a été obtenu.

2-2-2. Synthèse du ligand LIII

Etape 1

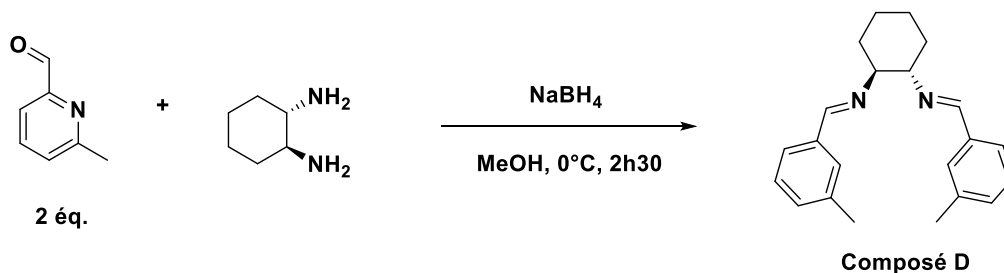


Schéma III-6.

La première étape de la synthèse démarre par la condensation de la cyclohexanediamine avec deux molécules de 6-méthylpicolinaldéhyde. Les imines sont ensuite réduites *in situ* par du tétraborohydrure de sodium pour former la diimine **D** avec un rendement de 85%.

Etape 2

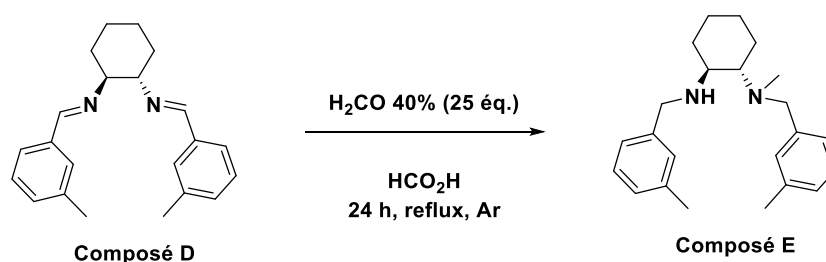


Schéma III-7.

La deuxième étape est la désymétrisation du composé **D** en réalisant une réaction de monométhylation (Schéma III-7). Il est primordial de garder une amine secondaire libre pour insérer le bras carboxylate permettant l'ancrage dans la protéine. Cette réaction est réalisée selon la méthode d'Eschweiler-Clarke en présence de formaldéhyde et d'acide formique.^{211, 212} Cette réaction conduit à la formation du produit monométhylé à hauteur de 80% et du produit diméthylé non souhaité à hauteur de 20%. Ces deux composés sont séparés par

chromatographie sur colonne de gel d'alumine afin d'offrir le composé **E** pur avec un rendement final de 66%.

Etape 3

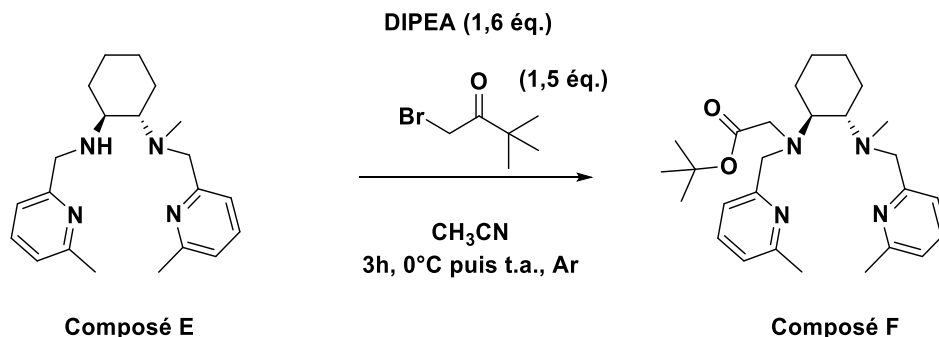


Schéma III-8.

La troisième étape consiste en l'insertion du groupement acide carboxylique sur l'amine secondaire (Schéma III-8). Comme pour la troisième étape de la synthèse du ligand L2, il est nécessaire de protéger le groupement acide carboxylique par une fonction ester pour faciliter la purification du produit. Comme précédemment décrit, la substitution nucléophile du brome du bromoacétate de *tert*-butyle est réalisée en présence de DIPEA pour piéger l'acide bromhydrique formé. Le composé **F** est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice et obtenu avec un rendement de 95%.

Etape 4

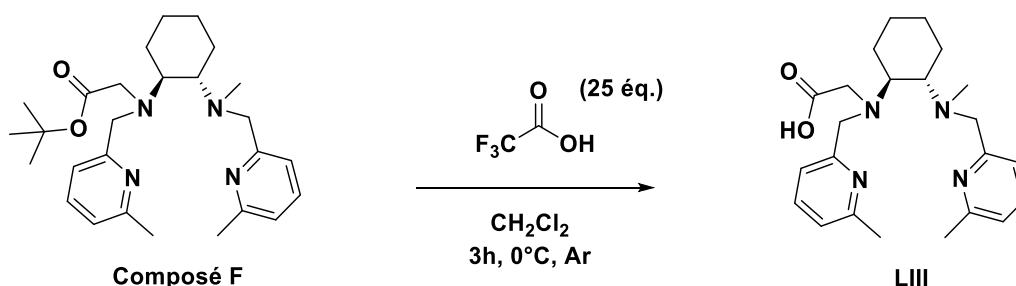


Schéma III-9.

La quatrième étape est la déprotection du groupement acide carboxylique par l'intermédiaire d'acide trifluoroacétique à 50% dans le DCM (Schéma III-9). Un large excès d'acide (25 éq.) est nécessaire pour obtenir des rendements corrects. Le produit réactionnel est ensuite précipité dans l'éther diéthylique puis le surnageant est retiré avant de sécher le produit sous

pression réduite. Cette opération a dû être recommencée une fois afin d'éliminer la totalité de l'acide et d'obtenir une poudre blanche avec un rendement de 60%. Un rendement global de 31% est obtenu après quatre étapes de synthèse.

2-3. Synthèse des complexes

2-3-1. Synthèse du complexe Fe-L2

Le complexe de **Fe-L2** a été synthétisé à partir de **FeCl₃** en milieu aqueux et à température ambiante. Pour cela, le ligand est dissous dans de l'eau en présence de trois équivalents de KOH. Ensuite, un équivalent de **FeCl₃** est additionné lentement avec l'apparition instantanée d'une couleur violette. Après une nuit sous agitation, le complexe précipite sous forme de poudre violette. Le complexe **Fe-L2** est obtenu avec un bon rendement de 65%.

2-3-2. Synthèse du complexe Fe-LIII

Afin d'éviter la dimérisation observée pour les complexes de Fe(III) avec ce type de ligands, la complexation du ligand **LIII** est réalisée en boîte à gants, dans l'acétone, avec **FeCl₂** et à température ambiante. Un précipité jaune apparaît au fil du temps. Après 24 heures d'agitation, de l'éther diéthylique est ajouté et le précipité est filtré et séché pour obtenir une poudre jaune avec un très bon rendement de 91%.

2-4. Caractérisations des complexes

2-4-1. Caractérisation par spectrométrie de masse ESI

Le spectre de masse en mode positif du complexe **Fe-L2** a été réalisé à l'air dans CH₃CN. Un pic est obtenu avec une valeur de m/z de 536, attribué à l'ion [Fe(III) + (L2-3H) + Cl]⁻. Cette valeur correspond à la déprotonation du ligand phénol et des deux fonctions acides carboxyliques. De plus, un ion chlorure, provenant de l'étape de complexation avec le FeCl₃, est lié sur l'ion ferrique.

Le spectre de masse du complexe de **Fe-LIII** a été réalisé sous atmosphère inerte dans CH₃CN/H₂O. Un comportement légèrement différent est observé puisque deux pics sont

obtenus en mode positif : un premier pic avec un m/z de 451 et une intensité relative de 100 et un deuxième pic possédant un m/z de 486 et une intensité relative de 18 qui correspond à l'ion ferrique $[\text{Fe}(\text{III}) + (\text{LIII-H}) + \text{Cl}^-]^+$ dû à l'oxydation partielle du Fe(II) en Fe(III) lors de l'injection en masse. Pour la première valeur de masse, le complexe de fer est déprotoné une fois au niveau de l'acide carboxylique. Pour la seconde, le complexe est aussi déprotoné une fois et un ion chlorure est lié sur l'ion ferrique.

Les spectres de masse attestent que les deux complexes de fer ont été obtenus sans la formation d'autres espèces telles que des dimères. Le ligand chloro est labile permettant l'activation d'une molécule d'oxydant ou une interaction avec un substrat exogène.

2-4-2. Caractérisation par spectroscopie d'absorption UV-Visible

Les spectres UV-Visible des complexes **Fe-L2** et **Fe-LIII** ont été réalisés à l'air, à température ambiante (**Figure III-4**).

Le complexe **Fe-L2** a été préparé dans une solution de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1 à une concentration de 800 μM . Il possède une large bande d'absorption à 562 nm qui correspond à une bande de transfert de charge du ligand phénolate vers l'ion ferrique (LMCT). La formation de cette bande permet de confirmer que l'ion ferrique est chélaté au ligand phénolate.

Le complexe **Fe-LIII** a été préparé dans $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1 à une concentration de 100 μM . Son spectre UV-Visible présente deux fortes bandes d'absorption à 242 nm et 264 nm. Ces bandes correspondent aux transitions électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ des ligands pyridines. De plus, deux autres bandes, situées à 315 et 349 nm, sont visibles et correspondent à des bandes de transfert de charge de l'ion ferrique vers les ligands pyridines (MLCT). Ces bandes de transfert de charge attestent de la formation du complexe.

Les études réalisées en spectroscopie UV-Visible complètent les résultats obtenus avec la spectrométrie de masse. Les complexes de fer peuvent donc être utilisés pour la formation des cristaux de **NiKA/Fe-Lx**.

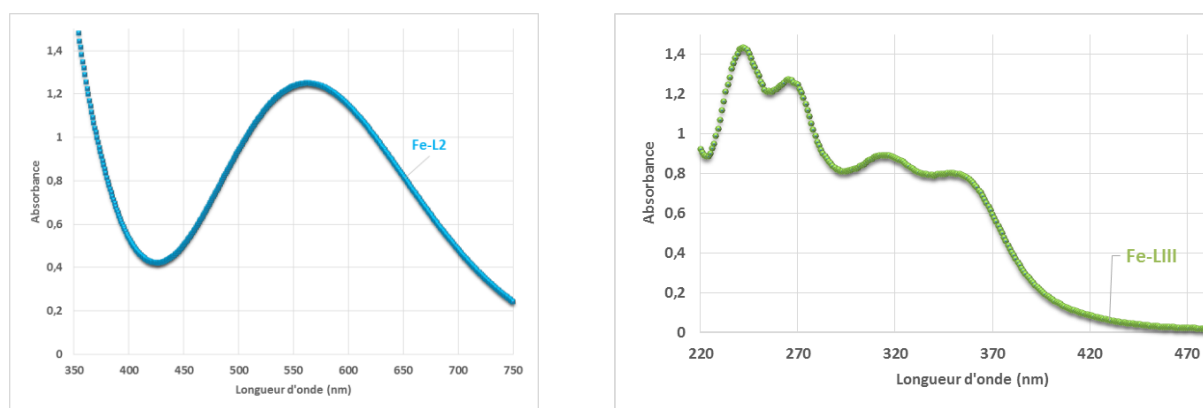


Figure III-4 : Spectres UV-Visible des complexes **Fe-L2** (bleu, 800 μM) et **Fe-LIII** (vert, 100 μM).

2-5. Préparation et caractérisation des cristaux de NikA/Fe-Lx

2-5-1. Préparation des cristaux de NikA/Fe-Lx

Après avoir synthétisé les complexes de fer souhaités, l'intérêt s'est porté sur la préparation et la caractérisation des cristaux de **NikA/Fe-LX**. Ces cristaux d'hybrides ont été préparés selon la méthode d'échange de complexe. Cette méthodologie est réalisée en deux étapes : une première étape de co-cristallisation de NikA avec le complexe de **Fe-EDTA** et une deuxième étape de remplacement du complexe de **Fe-EDTA** par le complexe choisi, par la méthode de trempage. Cette méthodologie est privilégiée car la formation des cristaux de **NikA/Fe-EDTA** est réalisée de manière très reproductible en formant de gros cristaux qui diffractent à une bonne résolution (2 Å). De plus, cela permet de travailler avec des cristaux possédant une structure identique peu importe le complexe inséré dans la deuxième étape.

2-5-2. Détermination des structures cristallographiques

Les structures cristallographiques des deux nouveaux hybrides démontrent la capacité des nouveaux complexes **Fe-L2** et **Fe-LIII** à substituer le complexe de **Fe-EDTA** au sein de la protéine NikA (**Figure III-5**). D'après ces structures, chaque nouveau complexe présente un taux d'occupation du ligand et du métal proche de 1 attestant que le complexe de **Fe-EDTA** a été remplacé avec succès.

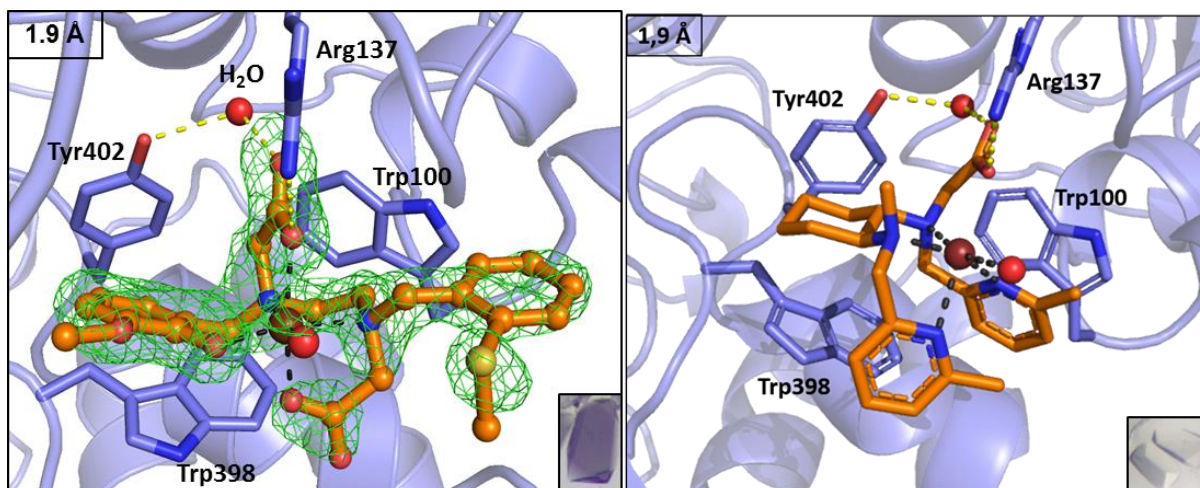


Figure III-5 : Structures cristallographiques des hybrides *NikA/Fe-L2* (à gauche) et *NikA/Fe-LIII* (à droite).

Comme pour l'hybride **NikA/Fe-L1**, dans les hybrides **NikA/Fe-L2** et **NikA/Fe-LIII**, l'atome de fer adoptent une géométrie octaédrique. De façon prévisible, l'ancrage principal des deux complexes au sein de la protéine *NikA* est issu majoritairement de la formation d'un pont salin entre un des groupements carboxylate du ligand et l'arginine 137 de la protéine. Ce même groupement carboxylate est stabilisé par une interaction avec une molécule d'eau liée à la Tyr402. De plus, des interactions de type π -stacking sont possibles entre un des cycles aromatiques (pyridine ou phénolate) et le tryptophane 398. Dans les cas de **NikA/Fe-L2**, la première sphère de coordination est composée de deux atomes d'azote, provenant de l'éthylène diamine, et de quatre atomes d'oxygène, provenant du ligand phénolate, des deux ligands carboxylates et d'une molécule d'eau. Les deux ligands carboxylates se situent en positions apicales tandis que les ligands azotés, le phénolate et la molécule d'eau se situent dans le plan équatorial.

Dans les cas de **NikA/Fe-LIII**, la modification du ligand a été efficace puisqu'on observe une seule topologie *trans* pour le complexe dans les deux molécules A et B. La sphère de coordination du Fe est composée de quatre atomes d'azote, provenant de l'éthylène diamine et des pyridines et de deux atomes d'oxygène, provenant du groupement carboxylate et d'une molécule d'eau. Le ligand carboxylate et un des deux ligands pyridines se situent en positions apicales alors que la 2^{ème} pyridine, les deux atomes d'azote de l'éthylène diamine et la molécule d'eau se retrouvent dans le plan équatorial.

2-5-3. Réactivité *in crystallo* des cristaux et NikA/Fe-L2

Afin d'étudier la réactivité de l'hybride **NikA/Fe-L2** vis-à-vis de l'oxygène, les cristaux NikA/Fe-L2 ont été exposés à l'air après réduction par le DTT, comme décrit précédemment pour les hybrides **NikA/Fe-L0** et **NikA/Fe-L1**(Figure III-6).

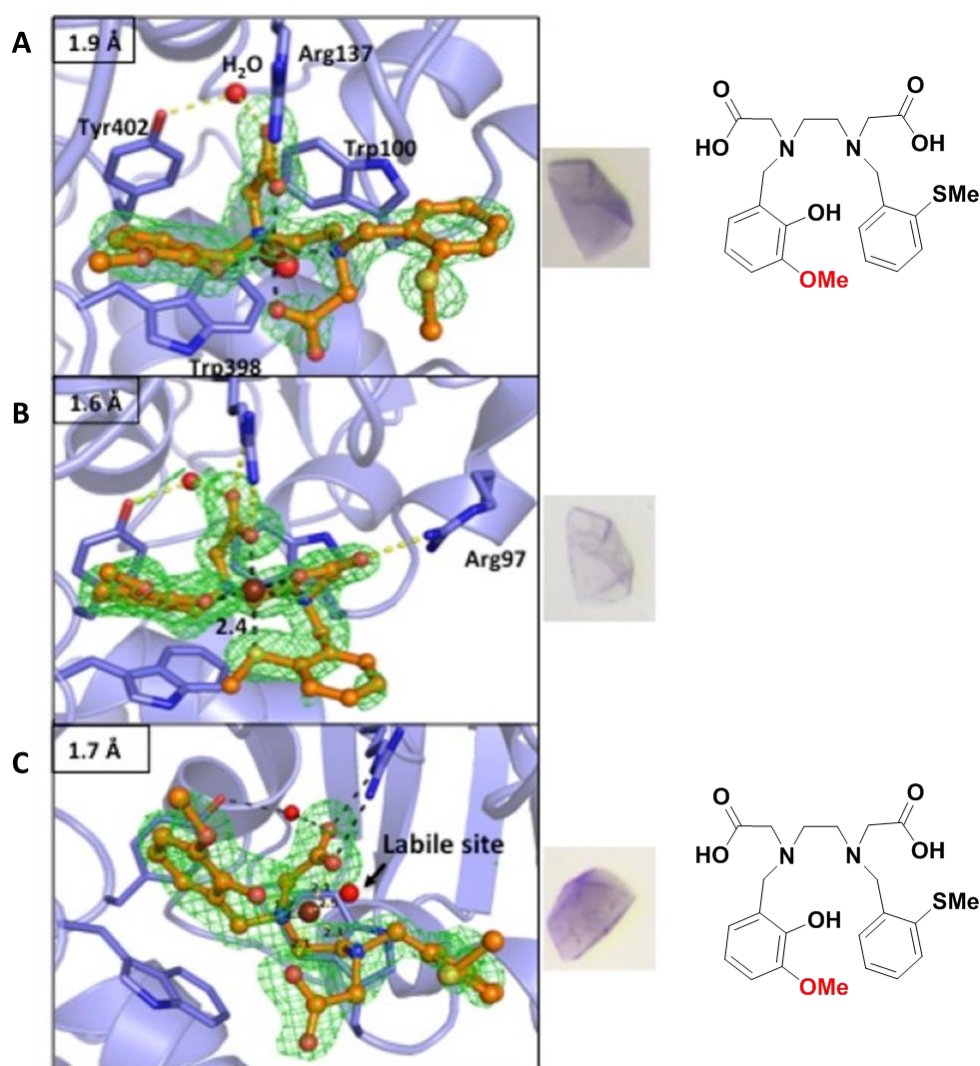


Figure III-6 : Structures cristallographiques de l'hybride **NikA/Fe-L2**. **A**) à l'état initial, **B**) après réduction en boîte à gants en présence de DTT, **C**) en présence d'O₂ après l'étape de réduction.

La structure cristallographique de l'hybride réduit est similaire à celle obtenue avec l'hybride **NikA/Fe-L1**(**B**). La même réorganisation partielle du complexe est observée avec un changement de position entre le groupement carboxylate en position apicale et le ligand benzylthioéther dans le plan équatorial. Le ligand phénolate, quant à lui, reste à la même

position équatoriale, près du centre métallique. De plus, contrairement à l'hybride **NikA/Fe-L1**, l'hybride **NikA/Fe-L2** en présence d'O₂ ne subit aucune hydroxylation aromatique ce qui n'induit aucune modification au niveau du ligand. Une position labile est donc toujours présente dans la sphère de coordination du fer permettant d'envisager de réaliser des réactions de catalyse d'oxydation avec ce type d'hybride.

Cependant, afin de tester la réactivité des cristaux de **NikA/Fe-L2** dans des expériences de catalyse, il est nécessaire de les stabiliser par réticulation. En effet, les cristaux ne sont stables que dans leur tampon de cristallisation et se solubilisent en absence de sulfate d'ammonium.

3. Mise en place des conditions de réticulation et caractérisations des systèmes

Dans les systèmes CLEC déjà développés dans la littérature, les conditions de réticulation sont très variables et dépendent de la protéine utilisée (tampons, concentrations en glutaraldéhyde et temps de réticulation). La première étape a donc été de déterminer des conditions de réticulation qui permettent d'obtenir des cristaux stables dans un mélange CH₃CN/H₂O 1/1 en variant : (i) le tampon utilisé pour réaliser la réticulation, (ii) la concentration en glutaraldéhyde et (iii) le temps de réticulation.

3-1. Variations des tampons de cristallisation

Le tampon utilisé et son pH peuvent avoir une grande influence sur la stabilité des cristaux. Deux solutions de réticulation différentes sont alors préparées : (i) une solution contenant 10% de glutaraldéhyde dans du tampon Tris-HCl pH 7 (Tampon A) et (ii) une solution contenant 10% de glutaraldéhyde dans du tampon acétate de sodium pH 4,6 (tampon B), en présence de sulfate d'ammonium (voir détails dans la partie expérimentale). Les deux solutions sont ensuite ajoutées indépendamment sur une goutte contenant des cristaux (5% de glutaraldéhyde final) et la réaction de réticulation est laissée pendant 30 min.

Dans le cas du tampon **A**, la solution est limpide et jaune, les cristaux ne se fissurent pas et aucune solubilisation n'est observée après transfert dans la solution de CH₃CN/H₂O 1/1. En revanche, dans le cas du tampon **B**, un polymère résiduel est observé en surface de la goutte et les cristaux réticulés se fissurent au fur et à mesure de la réticulation. Ce manque de stabilité

peut être dû soit au pH, légèrement plus acide dans le cas du tampon **B**, soit à la nature même du tampon. Le tampon **A** est donc choisi pour la suite des expériences.

3-2. Variations de la concentration en glutaraldéhyde

Des solutions de glutaraldéhyde à différentes concentrations ont été préparées. L'expérience de réticulation a été réalisée sur 30 minutes puis l'aspect de la goutte ainsi que le comportement des cristaux dans un mélange CH₃CN/H₂O 1/1 ont été comparés (**Tableau III-1**).

Tableau III-1 : Aspect des cristaux après différentes conditions de réticulation.

	0% glutaraldéhyde (final)	1% glutaraldéhyde (final)	3% glutaraldéhyde (final)	5% glutaraldéhyde (final)	10% glutaraldéhyde (final)
<i>Aspect de la goutte de cristallisation</i>	Transparente, limpide	Légèrement jaune, limpide	Jaune, limpide	Jaune foncé, formation d'un polymère (faible)	Jaune foncé, formation d'un polymère
<i>Comportement des cristaux dans CH₃CN/H₂O 1/1</i>	Solubilisation instantanée	Solubilisation après quelques minutes	Solubilisation après quelques heures	Pas de solubilisation	Pas de solubilisation

Sans glutaraldéhyde, les cristaux se solubilisent instantanément dans la solution de CH₃CN/H₂O 1/1 ou même dans H₂O pure. Pour les solutions à 1 et 3% de glutaraldéhyde, la solution devient jaune et aucun polymère résiduel n'est formé. Cependant, les cristaux ne sont pas très stables en solvant organique puisqu'ils se solubilisent après quelques minutes seulement. Pour la solution à 5% de glutaraldéhyde, une coloration jaune est aussi apparue et un polymère résiduel est observé. Par contre, les cristaux ne se solubilisent pas lors de leur transfert dans la solution de CH₃CN/H₂O 1/1. Pour la solution à 10% de glutaraldéhyde, la formation d'un polymère résiduel jaune est observée à la surface de la goutte même après plusieurs jours : ce polymère pourrait être formé d'un mélange de glutaraldéhyde et de tampon Tris (contenant des amines). A noter que ce polymère se forme même en absence de cristaux.

Les cristaux ne se solubilisent pas non plus au cours du temps montrant leur grande stabilité vis-à-vis du mélange CH₃CN/H₂O 1/1.

Ces premiers tests sont concluants : le glutaraldéhyde stabilise les cristaux de **Nika/Fe-EDTA** qui ne se solubilisent pas dans un mélange CH₃CN/H₂O 1/1. Finalement, le choix s'est porté sur la condition 5% de glutaraldéhyde afin d'avoir la plus grande stabilité des cristaux en évitant au maximum la formation du polymère résiduel. Ce polymère formé pourrait avoir une incidence sur la réactivité de la réaction (consommation de l'oxydant, autre réactivité, etc...).

3-3. Optimisation du temps de réticulation

Dans cette expérience, l'objectif était de déterminer l'influence du temps de réticulation sur la stabilité des CLEC. Après la réticulation des cristaux de **Nika/Fe-EDTA** (30 minutes, solution à 5% de glutaraldéhyde final), les cristaux transférés dans une solution de CH₃CN/H₂O 1/1 ne se solubilisaient pas. Pour pouvoir tester l'influence du temps de réticulation sur la stabilité des CLEC, il est nécessaire de les mettre dans des conditions plus drastiques. Pour cela, ils ont été mis en présence d'un oxydant fort, NaOCl, utilisé pour la sulfoxydation de thioéthers avec l'hybride **Nika/Fe-LIII** (**Tableau III-2**).

Lors de ces expériences, plusieurs paramètres ont été testés : (i) le temps de réticulation, (ii) la concentration en NaOCl, (iii) le temps d'exposition des cristaux au NaOCl. Pour le temps de réticulation, trois temps ont été comparés : 30 min (référence), 5 h et 16 h. Concernant la concentration en NaOCl, deux quantités ont été testées : 225 équivalents, quantité de NaOCl utilisée dans les conditions standard de catalyse, et 10 000 équivalents, quantité extrême pour pousser le système catalytique jusqu'à son maximum. Pour le dernier point, le temps d'exposition des cristaux au NaOCl, trois temps ont été comparés : 5 min, 5 h et 16 h. Ces valeurs ont été choisies arbitrairement pour avoir une idée globale.

Lorsque les cristaux sont réticulés 30 minutes, leur stabilité en présence d'un oxydant fort est limitée. En effet, en présence de 225 éq. de NaOCl, les cristaux commencent à se solubiliser au bout de quelques heures (**Entrée 2**) et ont totalement disparu au bout de 16 h (**Entrée 3**). De plus, en présence d'un très large excès d'oxydant, ils sont solubilisés en moins de 5

Chapitre III : Développement d'une biocatalyse hétérogène

minutes (**Entrée 4**). Cette méthode de réticulation n'est certainement pas adaptée pour nos catalyses. Le temps de réticulation a donc été augmenté afin d'améliorer la stabilité du système. Après 5 h de réticulation, la stabilité des cristaux est largement améliorée (**Entrées 2 et 3**). A 225 éq. de NaOCl, les cristaux restent intacts même après 16 h d'incubation avec l'oxydant. En revanche, en présence d'un très large excès en oxydant, ils se solubilisent rapidement (**Entrée 4**). Après 16 h de réticulation, les cristaux améliorent encore leur stabilité puisqu'ils restent intacts en présence de 225 éq. de NaOCl (**Entrée 3**) et lors de leur incubation avec un large excès de NaOCl, ils ne se sont solubilisés que partiellement après 5 h (**Entrée 5**). En revanche après 16 h de réticulation, un polymère résiduel très compact est formé duquel il est impossible de séparer les cristaux.

Tableau III-2 : Influence de la variation du temps de réticulation sur la stabilité des cristaux.

<i>Entrée</i>	NaOCl (temps)	Réticulation 30 min	Réticulation 5 h	Réticulation 16 h
1	225 éq. 5 min	Cristaux intacts	Cristaux intacts + polymère résiduel faible	Cristaux intacts + polymère résiduel important
2	225 éq. 5 h	Solubilisation partielle	Cristaux intacts + polymère résiduel faible	Cristaux intacts + polymère résiduel important
3	225 éq. 16 h	Solubilisation totale	Cristaux intacts + polymère résiduel faible	Cristaux intacts + polymère résiduel important
4	10 000 éq. 5 min	Solubilisation totale	Solubilisation partielle + polymère résiduel faible	Cristaux intacts + polymère résiduel important
5	10 000 éq. 5h	Solubilisation totale	Solubilisation totale + polymère résiduel faible	Solubilisation partielle + polymère résiduel important
6	10 000 éq. 16 h	Solubilisation totale	Solubilisation totale + polymère résiduel faible	Solubilisation totale + polymère résiduel important

Finalement, le temps de réticulation possède un fort impact sur la stabilité des cristaux de **NiK/Fe-EDTA** en présence d'un oxydant fort (NaOCl). La réticulation des cristaux pendant 5 h constitue certainement le meilleur compromis possible entre stabilité des cristaux et formation du polymère non désiré.

3-4. Caractérisations des CLEC NikA/Fe-Lx

Les caractérisations des **CLEC NikA/Fe-Lx** ont été effectuées sur des cristaux réticulés pendant 5 h.

3-4-1. Dosage en protéine et en fer

Au vu de la difficulté à dissoudre les cristaux après réticulation, la détermination de la quantité de protéine NikA a été réalisée sur des cristaux non réticulés par une technique de chromatographie d'exclusion stérique, SEC-MALLS. Cette technique a permis de déterminer qu'un cristal de **NikA/Fe-EDTA** contenait en moyenne 12,4 pmol de protéine NikA (avec une erreur de 1,5 pmol). Lors d'une réaction de catalyse, 100 cristaux sont utilisés dans un volume réactionnel de 40 μ L correspondant à une concentration moyenne en protéine de 31 μ M.

Le dosage en fer au sein des cristaux s'effectue par une méthode dérivée de celle de Fish.²¹³ Cette méthode de dosage a été appliquée aux **CLEC NikA/Fe-L2** avant catalyse. En moyenne, un cristal contient 12,8 pmol de Fe (avec 5% d'erreur). Lors d'une réaction de catalyse, 100 cristaux sont utilisés dans un volume réactionnel de 40 μ L correspondant à une concentration moyenne en fer de 32 μ M.

Ces deux méthodes de dosage permettent de mettre en évidence la présence d'un complexe de fer par protéine dans les **CLEC NikA/Fe-Lx** (**Tableau III-3**). Pour la suite des expériences de catalyse (calcul de ratios, calcul de TON, etc...), nous avons considéré que la concentration en catalyseur pour 100 **CLEC NikA/Fe-Lx** était de 31 μ M.

Tableau III-3 : Résultats des dosages en protéine et en fer.

	nmol protéine NikA	nmol fer	Rapport NikA/fer
100 cristaux	1,24	1,28	0,97

3-4-2. Cristallographie par diffraction aux rayons X

Un des avantages de l'utilisation de la méthodologie CLEC est de pouvoir caractériser les hybrides par cristallographie même après réticulation. Bien que le traitement au glutaraldéhyde ait un impact sur la résolution des différentes structures cristallographiques (2,6 Å au lieu de 1,8 Å), cela permet d'acquérir de nombreuses informations sur notre objet d'intérêt avant son utilisation en catalyse (**Figure III-7**). En revanche, lorsque les CLEC sont mis en présence du mélange CH₃CN/H₂O 1/1, ils ne diffractent plus. La résolution de structures après catalyse n'est donc pas envisageable.

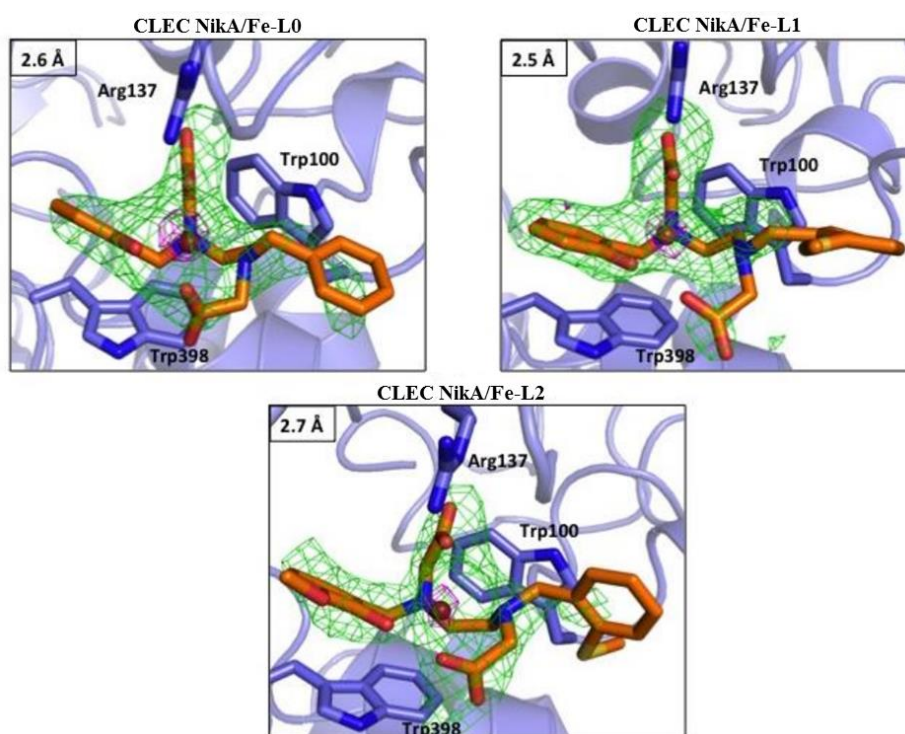


Figure III-7 : Structures cristallographiques des *CLEC Nika/Fe-Lx* (0, 1 et 2). La carte de densité électronique de type OMIT est représentée en vert et la carte anormale des CLEC au sélénium en magenta. Le contour de la carte est entre $2,5\sigma$ (carte OMIT) et $4,5\sigma$ (carte anormale).

Les structures cristallographiques des **CLEC Nika/Fe-L0**, **Nika/Fe-L1** et **Nika/Fe-L2** ont été résolues. La superposition des structures avec celles obtenues avant réticulation montrent que les complexes occupent toujours la même position. De plus, dans chacune des structures, les taux d'occupation de l'ion métallique et du ligand sont proches de 1 attestant que le

traitement au glutaraldéhyde n'intervient pas sur l'intégrité du site actif des hybrides cristallisés.

3-4-3. Fluorescence X

L'utilisation de la spectrométrie de fluorescence X peut permettre de déterminer la présence de métaux au sein d'un échantillon de manière qualitative. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la présence du fer au sein des cristaux de **NikA/Fe-L2** avant et après réticulation (**Figure III-8**).

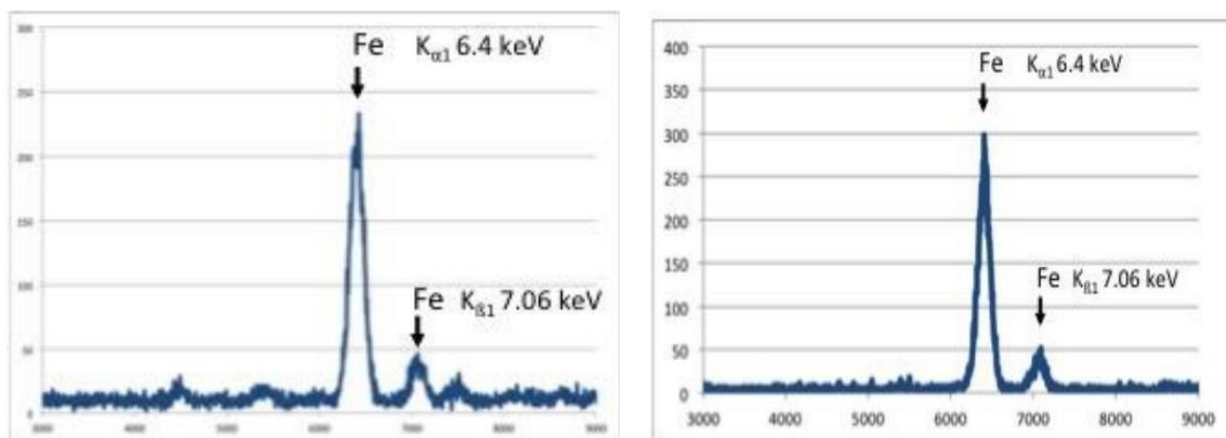


Figure III-8 : Spectre de fluorescence X sur les CLEC NikA/Fe-L2 avant (à gauche) et après (à droite) traitement au glutaraldéhyde.

Sur les spectres de fluorescence, deux pics sont observés correspondant au fer. Le spectre de fluorescence X d'un CLEC **NikA/Fe-L2** après traitement au glutaraldéhyde montre que le fer est toujours présent dans le cristal. Ces résultats permettent de conclure que le traitement au glutaraldéhyde n'affecte pas l'objet catalytique et de consolider les différentes caractérisations déjà effectuées sur les CLEC.

4. Réactivité en sulfoxydation des CLEC NikA/Fe-LIII

4-1. Transposition de la réactivité de sulfoxydation des hybrides en solution à la catalyse hétérogène

Après la préparation et la caractérisation des systèmes CLEC NikA/Fe-Lx, l'intérêt du projet s'est porté sur le développement d'un système efficace en catalyse d'oxydation. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à transposer la réactivité de sulfoxydation déjà développée au laboratoire quelques années auparavant aux systèmes CLEC.¹¹ Cette réaction d'oxydation avait été réalisée avec les hybrides NikA/Fe-LI et NikA/Fe-LII (ligands de la famille N₂Py₂) sur des substrats thioéthers en utilisant NaOCl comme oxydant (Schéma III-1 et III-10).

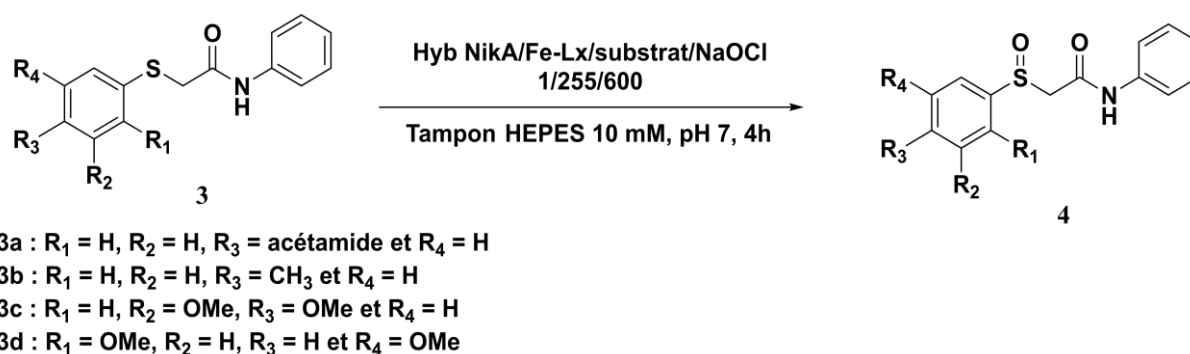


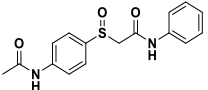
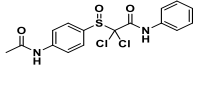
Schéma III-10 : Réaction de sulfoxydation type réalisée par les hybrides NikA/Fe-LI et NikA/Fe-LII.

Les conditions réactionnelles avaient été optimisées sur le substrat **3a** : la concentration en catalyseur était de 37 μ M avec un ratio catalyseur/substrat/NaOCl de 1/255/600 et le milieu réactionnel était agité à température ambiante pendant 4 heures (Tableau III-4).

Lors de cette catalyse, deux produits réactionnels avaient été obtenus : le sulfoxyde **4a** et le sulfoxyde dichloré **4aCl₂**. L'hybride NikA/Fe-LI catalysait la réaction avec de bons rendements en sulfoxyde **4a** (69%) et une sélectivité intéressante (87% pour le sulfoxyde **4a** vis-à-vis du composé dichloré et 100% vis-à-vis de la sulfone. Lorsque cette réaction avait été réalisée sans catalyseur ou en présence du complexe Fe-LI, uniquement le composé dichloré avait été formé. La protéine NikA seule avait une réactivité bien qu'elle soit beaucoup plus faible que celle de l'hybride (< 10%). En comparaison, l'hybride NikA/Fe-LII

atteignait des rendements et une sélectivité comparable à l'hybride **NikA/Fe-LI** (64% de rendement et 90% de sélectivité). Ensuite, cette réactivité avait été testée sur les substrats **3b**, **3c** et **3d** en présence l'hybride **NikA/Fe-LII**. De bons rendements avait été obtenus pour les substrats **3b** et **3d** (78% et 40% respectivement) avec une chimiosélectivité de 100%. En revanche, le substrat **3c** n'avait réagi que très peu en présence d'hybride.

Tableau III-4 : Catalyse d'oxydation des substrats **3** avec et sans l'hybride **NikA/Fe-LI**.

Substrat	Hybride NikA/Fe-LI	Rendement (%) 	Rendement (%) 	TON ^[a]	Sélectivité (%) ^[b]
3a	Oui	60	9	155	87
	Non	0	9	-	0
3b	Oui	78	0	199	100
	Non	10	0	-	100
3c	Oui	3	15	8	17
	Non	3	12	-	2
3d	Oui	40	0	102	100
	Non	3	11	-	20

^[a] Nombre de cycle catalytique vis-à-vis de la production de sulfoxyde. ^[b] sulfoxyde / composé dichloré.

Bien que ces résultats soient encourageants, la gamme de substrat utilisée est encore assez restreinte. En effet, ces substrats sont peu solubles en milieu aqueux ce qui ralentit considérablement la cinétique de la réaction et donc l'activité catalytique de ces hybrides. De plus, cette réaction nécessite l'emploi d'un oxydant fort, NaOCl, ce qui pose des problèmes de stabilité de la protéine dans ces conditions réactionnelles.

Pour améliorer la solubilité des substrats et la stabilité de la protéine, cette réactivité a été transposée au système hétérogène CLEC en réalisant la catalyse en présence de solvant organique. La réactivité en solution étant équivalente entre l'hybride **NikA/Fe-LI** et **NikA/Fe-LII**, le choix s'est porté sur l'hybride **NikA/Fe-LII**. En effet, le ligand possède une plus grande rigidité ce qui pourrait améliorer la sélectivité de la réaction. Les CLEC **NikA/Fe-LII** (31 µM) ont donc été testés en catalyse de sulfoxydation du substrat **3a** en présence de NaOCl avec un ratio catalyseur/substrat/oxydant identique aux conditions en

Chapitre III : Développement d'une biocatalyse hétérogène

solution (1/255/600). Par contre, la réaction est agitée à température ambiante, dans une solution de CH₃CN/H₂O 1/1 pendant une heure seulement (**Schéma III-11**). Les résultats sont présentés dans le **Tableau III-5**.

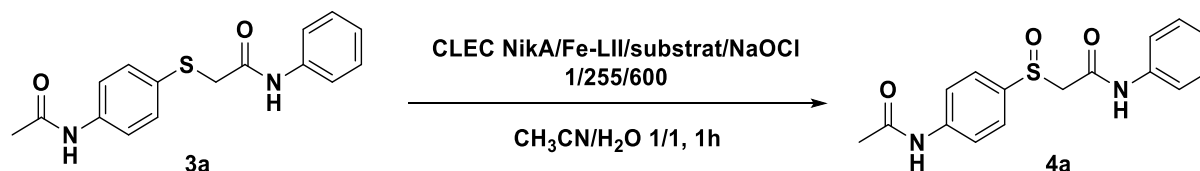
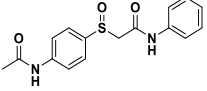
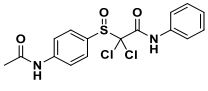


Schéma III-11 : Réaction de sulfoxydation type réalisée avec les **CLEC NikA/Fe-LII**.

Tableau III-5 : Catalyse d'oxydation du substrat **3a** avec les **CLEC NikA/Fe-LII** et **NikA/Fe-LIII**.

Entrée	Catalyseur	Rendement (%)	Rendement (%)	TON ^[a]	Sélectivité (%) ^[b]
					
1	CLEC NikA/Fe-LII	82	15	209	85
2	NikA/Fe-LII	64	6	163	90
3	Fe-LII	3	23	8	12
4	CLEC NikA/Fe-LIII	84	14	214	86
5	Fe-LIII	3	25	8	11
6	CLEC NikA/Fe-EDTA	5	41	13	11
7	Fe-EDTA	4	40	10	9
8	-	6	45	-	12

^[a] Nombre de cycle catalytique vis-à-vis de la production de sulfoxyde. ^[b] sulfoxyde : composé dichloré.

Le premier point à aborder est de déterminer si la réaction provient bien du catalyseur inséré au sein des cristaux. Pour cela, la réactivité des **CLEC NikA/Fe-LII** a été comparée aux **CLEC NikA/Fe-EDTA**, inactif pour cette réactivité, au complexe **Fe-LII** seul et à l'absence de catalyseur (**Tableau III-5**). En présence des **CLEC NikA/Fe-LII**, un très bon rendement de 82% en faveur du sulfoxyde **4a** a été obtenu (**Entrée 1**). En revanche, en présence des **CLEC NikA/Fe-EDTA**, du complexe **Fe-LII** seul ou en absence de catalyseur, quasiment aucune réactivité n'est observée (**Entrées 3, 6 et 8**).

Le deuxième point à aborder est de déterminer si l'activité catalytique des **CLEC NikA/Fe-LII** est améliorée par rapport à celle de l'hybride **NikA/Fe-LII** en milieu aqueux. En effet, des rendements de 82% en **4a** ont été atteints au lieu de 64% pour l'hybride en solution (**Entrée 2**). De plus, la cinétique est accélérée d'un facteur 6 ($3,5 \text{ min}^{-1}$ contre $0,63 \text{ min}^{-1}$). Ces différences peuvent être expliquées de différentes manières : (i) la concentration en catalyseur est beaucoup plus localisée dans les CLEC que dans l'hybride en solution ce qui doit favoriser l'amélioration de l'activité catalytique, (ii) les substrats sont plus solubles dans le mélange $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1.

Le troisième point est de déterminer l'apport des CLEC sur les différentes sélectivités de la réaction. Tout comme l'hybride en solution, le produit sulfone n'est pas formé quelles que soient les conditions réactionnelles utilisées (avec ou sans catalyseur, solvant organique, temps, etc...). La chimiosélectivité du catalyseur est donc de 100% en faveur de la formation du sulfoxyde par rapport à la sulfone. En revanche, une réaction non catalysée mène à la formation du sulfoxyde dichloré ce qui diminue la chimiosélectivité de la réaction globale (varie entre 9 et 86% en faveur du sulfoxyde). En présence des **CLEC NikA/Fe-LII** ou **CLEC NikA/Fe-LIII**, de très bonnes sélectivités sont obtenues (85 et 86%, respectivement) alors qu'en absence de catalyseur, ces valeurs sont drastiquement diminuées (entre 9 et 12% en faveur du sulfoxyde).

Les résultats obtenus en présence des **CLEC NikA/Fe-LIII** sont équivalents en termes de TON, de TOF et de sélectivités que les **CLEC NikA/Fe-LII**. De plus, aucun excès énantiomérique n'est obtenu, démontrant que la topologie du complexe n'a aucune incidence sur l'efficacité des catalyseurs hétérogènes.

Les **CLEC NikA/Fe-N₂Py₂** possèdent des propriétés catalytiques très intéressantes qui ont été améliorées par rapport aux hybrides en solution. Les rendements en sulfoxyde, le nombre de cycles catalytiques et la cinétique de la réaction ont été améliorés avec la mise en place des CLEC. En revanche, aucun impact n'a été observé sur la sélectivité de la réaction. Dans le cadre du développement de cette réactivité avec les CLEC, nous nous sommes intéressés à l'expansion de la gamme de substrat jusqu'alors limitée en milieu aqueux.

4-2. Extension de la gamme de substrats

Pour cribler à moindre coût de nombreux substrats (**3a-i**), les catalyses ont été faites avec 50 CLEC Nika/Fe-LIII (15 μ M) selon les mêmes conditions réactionnelles (Schéma III-12). Trois catégories de substrats ont été testés : (i) les substrats déjà testés avec les hybrides en solution (**3a-3d**), (ii) un substrat dérivé des précédents mais jamais testé en catalyse avec les hybrides (**3e**) et (iii) des substrats homologues possédant un groupement naphthyle au lieu d'un groupement phényle en position R₅ (**3f-3i**) (Figure III-9).

Premièrement, la diminution de la quantité de cristaux entraîne une diminution de la cinétique de la réaction ce qui se traduit par une chute du rendement de 84% à 15% pour le sulfoxyde **4a**. En dessous de 30 μ M, la concentration en catalyseur est trop faible pour une catalyse efficace et la réaction non catalysée est favorisée (formation du produit sulfoxyde dichloré > 30 %).

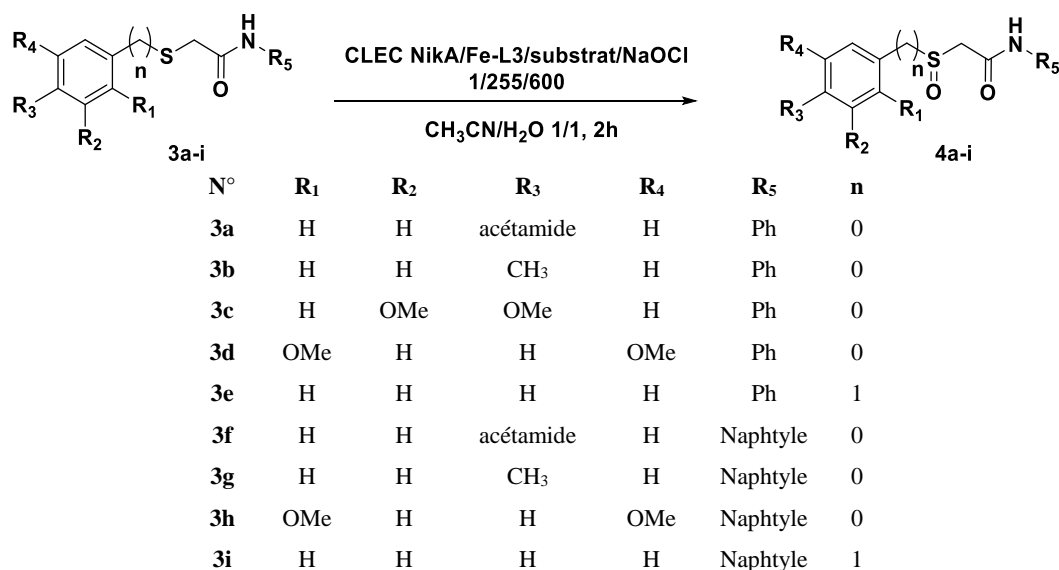


Schéma III-12 : Conditions réactionnelles de sulfoxydation avec les CLEC Nika/Fe-LIII.

Deuxièmement, en absence de catalyseur, les rendements en sulfoxyde obtenus sont inférieurs à 5%, peu importe le substrat utilisé, alors qu'en présence des CLEC Nika/Fe-LIII, des rendements en sulfoxyde, au moins équivalents à la référence **4a**, sont obtenus pour cinq autres substrats : **4b** (28%), **4d** (17%), **4e** (30%), **4g** (15%) et **4i** (15%). Deux substrats possédant un groupement naphthyle fonctionnent (**3g** et **3i**), ce qui est probablement dû à une meilleure solubilité de ces substrats dans le mélange CH₃CN/H₂O 1/1 plutôt que dans un

milieu 100% aqueux. Les substrats les plus encombrés (**3c**, **3f** et **3h**) ne présentent aucune réactivité démontrant que l'encombrement stérique a une influence importante sur la réactivité. Pour autant, aucun excès énantiomérique n'est obtenu.

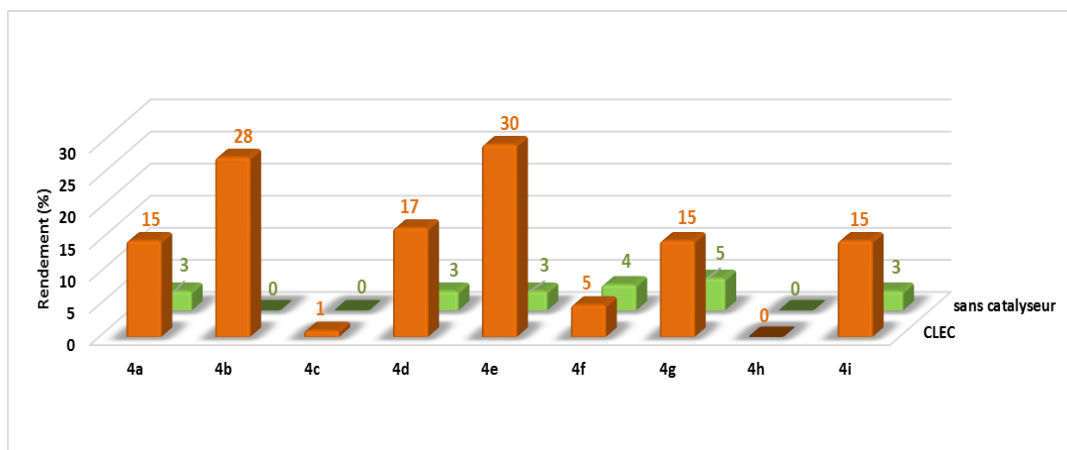


Figure III-9 : Rendements obtenus en sulfoxyde (**3a-3i**) en absence et en présence de 50 CLEC Nika/Fe-LIII.

Dans un second temps, une catalyse d'oxydation avec 100 CLEC Nika/Fe-LIII a été réalisée sur le substrat pour lequel l'atome de soufre n'est pas porté directement par le noyau aromatique (**7e**). De très bons rendements en sulfoxyde sont obtenus (89%) avec un nombre de cycles catalytiques atteignant 227. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec le substrat **3a** attestant de l'efficacité du système CLEC sur un substrat aliphatique moins activé.

La gamme de substrat a donc été élargie avec trois nouveaux substrats possédant une réactivité intéressante même en présence d'une quantité faible de catalyseur (15 μ M). En revanche, aucune énantiosélectivité n'a été observée même lors de l'utilisation de substrats plus encombrés et d'un catalyseur qui possède une seule topologie au sein des cristaux.

4-3. Etude de stabilité des CLEC Nika/Fe-LIII

Le développement d'une biocatalyse hétérogène devrait permettre de recycler le même catalyseur sur plusieurs tours de catalyse. Pour tester cela, une étude de stabilité a été réalisée sur les CLEC Nika/Fe-LIII dans les mêmes conditions réactionnelles présentées Schéma III-13.

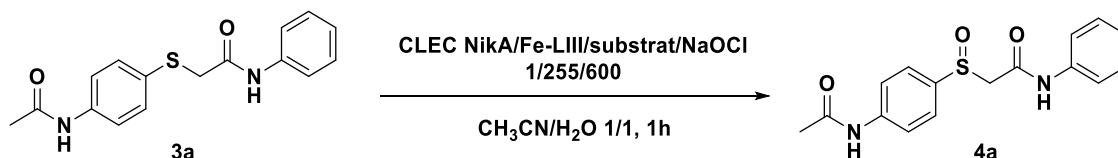


Schéma III-13 : Conditions réactionnelles pour les études de stabilité.

L'étude de stabilité se déroule selon le protocole suivant : une première expérience de catalyse est réalisée sur un lot de 100 CLEC NikA/Fe-LIII jamais utilisé. A la fin de la réaction, les substrats et produits sont extraits puis le milieu réactionnel est lavé abondamment avec une solution de CH₃CN/H₂O 1/1. Le surnageant est ensuite soutiré et une nouvelle expérience de catalyse peut alors être réalisée. Lorsque les CLEC deviennent inactifs, ils sont incubés avec une solution de complexe Fe-LIII fraîche (5 mM), pendant une nuit en boîte à gants, puis le milieu réactionnel est lavé abondamment avant la réalisation d'une nouvelle expérience de catalyse. Les résultats sont présentés Figure III-10.

Avec ce nouveau lot de CLEC, lors d'un premier tour de catalyse, les propriétés catalytiques initiales sont obtenues avec un rendement de 86% pour le sulfoxyde 4a, une sélectivité de 89% en faveur du sulfoxyde (comparé au sulfoxyde dichloré) et 219 TON. En comparaison, en absence de CLEC, seulement 3% de sulfoxyde 4a est formé avec une sélectivité de 9% en faveur du sulfoxyde. Lors du 2^{ème} tour de catalyse, l'activité catalytique diminue drastiquement avec seulement 20% de rendement pour 4a et avec une sélectivité moyenne de 39% en faveur du sulfoxyde. Ces résultats confirment la tendance observée lors de la mise en place des conditions de réticulation : NaOCl dégrade les CLEC NikA/Fe-LIII réticulés 5 h ce qui entraîne une perte d'activité catalytique importante.

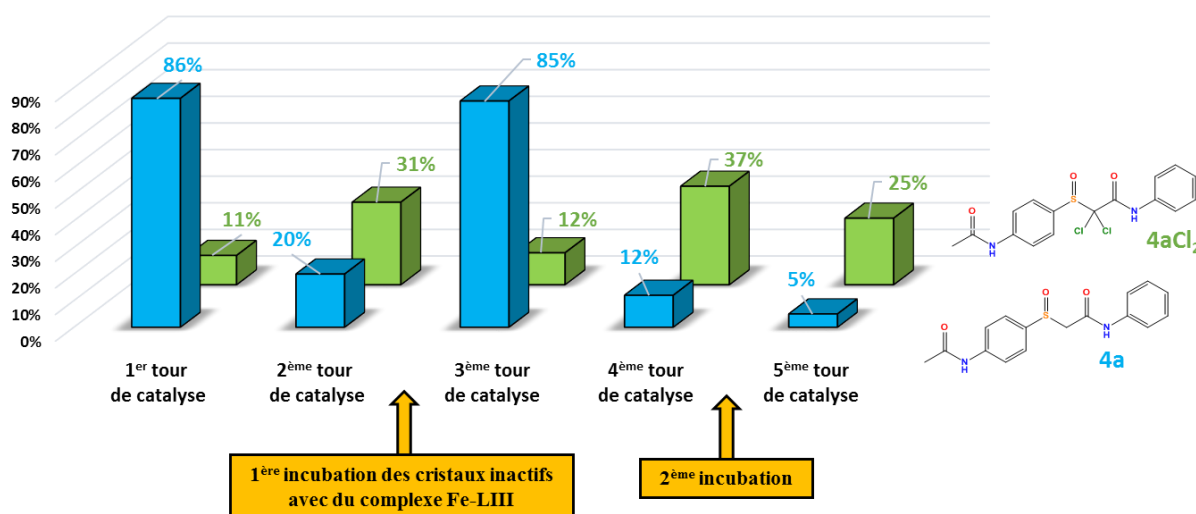


Figure III-10 : Stabilité des CLEC NikA/Fe-LIII sur la réactivité de sulfoxydation.

Chapitre III : Développement d'une biocatalyse hétérogène

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette perte d'activité : (i) les conditions de catalyse pourraient altérer les liaisons chimiques formées entre les protéines et le glutaraldéhyde, (ii) le ligand pourrait subir diverses oxydations et le complexe deviendrait donc inactif, (iii) le complexe **Fe-LIII** présent au sein des CLEC pourrait être relargué à l'extérieur des cristaux et donc perdre son activité catalytique et (iv) l'intégrité de la protéine et de son site actif pourrait être altérée par les conditions réactionnelles. La première hypothèse est réfutée. En effet, après le 2^{ème} tour de catalyse, les cristaux sont toujours présents dans la solution et restent intacts visuellement lors de leur observation à la loupe binoculaire. La deuxième hypothèse pourrait être vérifiée par spectrométrie de masse mais la quantité de catalyseur utilisée est trop faible pour que ce soit détectable. Une autre stratégie employée pour vérifier les hypothèses n°2 et n°3 a été d'incuber les **CLEC NikA/Fe-LIII** ayant perdus leur activité catalytique avec du complexe de **Fe-LIII**. Un 3^{ème} tour de catalyse est ensuite réalisé avec ce lot de **CLEC NikA/Fe-LIII**. D'excellents résultats ont été obtenus puisque l'activité catalytique a été retrouvée dans son intégralité (85% de rendement pour **4a** et 88% de sélectivité en faveur du sulfoxyde). Ces résultats montrent que les conditions réactionnelles ont eu un fort impact sur la stabilité du complexe (altération ou relargage).

Ensuite, un 4^{ème} tour de catalyse standard a été réalisé après lavage des **CLEC NikA/Fe-LIII**, et, encore une fois, l'activité catalytique est drastiquement diminuée (12% en **4a** et 24% de sélectivité en faveur du sulfoxyde). Suite à cela, une 2^{ème} incubation du complexe **Fe-LIII** avec ce lot de CLEC a été effectuée pour essayer de restaurer l'activité catalytique. Cependant, lors du 5^{ème} tour de catalyse, seulement 5% de **4a** est formé, valeur similaire aux catalyses réalisées en absence de catalyseur. Ces résultats démontrent que la protéine est aussi altérée au cours des catalyses dans ces conditions réactionnelles.

L'utilisation du NaOCl comme oxydant pour le développement d'une catalyse hétérogène avec des CLEC ne semble donc pas être une solution viable (trop destructeur). En effet, dès le 2^{ème} tour de catalyse, l'activité catalytique du système diminue drastiquement (de 86% à 20% en **4a**) due, soit au relargage du complexe **Fe-LIII** à l'extérieur des CLEC soit à l'altération du complexe dans ces conditions réactionnelles. Bien que l'activité ait pu être entièrement restaurée en incubant ce lot de CLEC inactifs avec du complexe **Fe-LIII** frais (85% en **4a**), l'activité catalytique est de nouveau diminuée (12% en **4a**) lors du 4^{ème} tour de catalyse, et une nouvelle incubation avec du complexe frais n'a pas permis de restaurer cette activité catalytique. L'utilisation d'un oxydant trop fort altère donc les différents constituants du

système catalytique (complexes, protéines, etc...). Malgré ce manque de stabilité, les **CLEC NikA/Fe-LIII** permettent de réaliser plus de 500 cycles catalytiques en cinq tours de catalyses, valeur supérieure à la plupart des métalloenzymes artificielles présentées dans le Chapitre I.

4-4. Conclusion

Cette première métalloenzyme artificielle hétérogène à base de **CLEC NikA/Fe-LIII** possède des propriétés catalytiques intéressantes. La transposition de la réactivité sulfoxydation des hybrides **NikA/Fe-N₂Py₂** en solution au système CLEC a permis d'améliorer les activités catalytiques ainsi que d'étendre la gamme de substrats. En effet, une cinétique cinq fois plus rapide est obtenue avec les CLEC avec un TOF de 3,65 min⁻¹ contre 0,7 min⁻¹ pour l'hybride en solution. Grâce au passage en milieu organique, de nouveaux substrats présentent une réactivité intéressante lors de cette catalyse (**7e**, **7g** et **7i**). En revanche, la faible stabilité des CLEC en présence d'un oxydant fort comme le NaOCl implique de trouver une nouvelle réactivité en utilisant un oxydant moins destructeur pour les CLEC.

5. Réactivité d'hydroxychloration d'alcènes

5-1. Recherche d'une nouvelle réactivité

Pour développer une nouvelle réactivité moins destructrice pour les CLEC, nous nous sommes inspirés des résultats obtenus avec l'hybride **NikA/Ru-bpza** développé au Chapitre II. L'hybride, en présence d'un oxydant fort (PIDA) et d'une source de chlore, catalyse l'hydroxychloration d'alcènes. En revanche, la transposition de cette réactivité aux CLEC nécessite quelques changements : (i) trouver un autre oxydant que PIDA, (ii) utiliser un autre catalyseur que le complexe de **Ru-bpza**, (iii) trouver des conditions réactionnelles où le chlore n'est pas le réactif limitant et (iv) éviter l'utilisation du tampon Tris-HCl comme source de chlore. Concernant le premier point, PIDA est un oxydant très fort qui risque d'altérer les CLEC au même titre que le NaOCl. Il est donc primordial de trouver une alternative à cet oxydant. D'après la littérature, des réactions d'hydroxychloration ont été développées en utilisant l'Oxone® comme oxydant.^{204, 214} Concernant le deuxième point, la préparation des cristaux de **NikA/Ru-bpza** est difficile et peu reproductible du fait de la faible solubilité du complexe dans les tampons aqueux. Il semble donc judicieux de tester d'autres complexes plus solubles comme les complexes de la famille **Fe-Ox** (**Fe-L1** et **Fe-L2**). A titre de comparaison, deux autres complexes ont été testés comme témoins négatifs : le complexe de **Fe-EDTA** et le complexe de **Ni-EDTA**. Généralement, le complexe de **Fe-EDTA** ne possède pas d'activité catalytique intrinsèque à cause de la saturation de la sphère de coordination du métal. Quant au complexe de **Ni-EDTA**, le nickel ne possède pas d'activité rédox ce qui permettrait de répondre à certains questionnements concernant le mécanisme réactionnel de la réaction. Pour le troisième point, afin de développer le catalyseur le plus efficace en termes de rendements et de TON, il serait intéressant d'augmenter les quantités de chlore utilisées dans les expériences de catalyse (75 équivalents pour l'hybride **NikA/Ru-bpza**). Finalement, il serait intéressant de remplacer le tampon Tris-HCl par du NaCl, source de chlore généralement utilisée pour ce type de réactions.

Une première expérience de catalyse d'hydroxychloration a donc été réalisée en présence de 100 CLEC **NikA/Fe-L** (L : EDTA, L1 ou L2) sur l' α -méthylstyrène en présence d'Oxone® et de NaCl selon les conditions réactionnelles présentées **Schéma III-14**. Les résultats sont présentés dans le **Tableau III-6**.

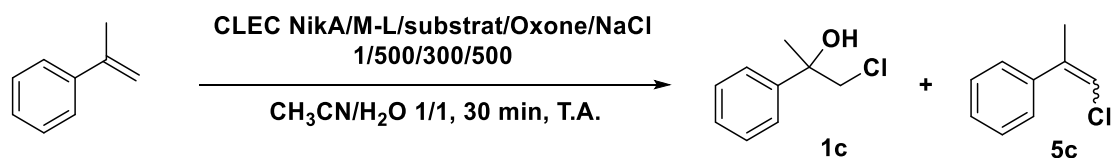
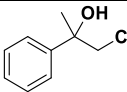
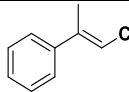


Schéma III-14 : Réaction d'hydroxychloration de l' α -méthylstyrène par différents CLEC.

Tableau III- 6 : Comparaison de la réaction d'hydroxychloration de l' α -méthylstyrène avec les différents CLEC.

Entrée	Catalyseur	 Rendement (%) ^[b]	 Rendement (%) ^[b]	TON ^[c]
1	CLEC NikA/Fe-L1	89	10	297
2	CLEC NikA/Fe-L2	90	9	297
3	CLEC NikA/Fe-EDTA	55	8	189
4	Fe-L1 ou Fe-L2	0	0	0
5	-	0	0	-
6	NikA/Fe-L1 en solution ^[a]	0	0	0
7	NikA/Fe-L2 en solution ^[a]	0	0	0
8	CLEC NikA/Ni-EDTA	9	0	68
9	Ni-EDTA	0	0	0

^[a] Catalyses réalisées dans un mélange HEPES/Tris-HCl/CH₃CN 88/7/5. ^[b] Rendements obtenus sur 300 équivalents d'oxydant. ^[c] Nombre de TON totaux obtenus. Les CLEC NikA/Ni-EDTA sont utilisés comme témoin négatif.

Premièrement, seuls les CLEC ont une activité catalytique (Tableau III-6, entrées 1, 2, 3 et 8). Grâce à l'utilisation de la catalyse hétérogène, une nouvelle réactivité a pu être créée. En présence des CLEC NikA/Fe-L2, deux produits réactionnels sont obtenus : le 1-chloro-2-phénylpropan-2-ol (**1c**) et le (1-chloroprop-1-èn-2-yl)benzène (**5c**). Un rendement quantitatif a été obtenu avec une sélectivité de 91% en faveur de la chlorhydrine. La formation du produit **5c** est probablement due à une réaction de déshydratation causée par le pH acide du mélange réactionnel (pH 2).

Deuxièmement, l'activité catalytique des CLEC NikA/Fe-L1 et CLEC NikA/Fe-L2 est similaire (99% de rendement global) (Entrées 1 et 2). La réaction étant complète, il est difficile de discriminer le rôle du ligand dans l'activité catalytique. Pour cela, il serait

nécessaire de comparer les cinétiques de réaction. De plus, de façon surprenante, les **CLEC NikA/Fe-EDTA** possèdent une activité catalytique non négligeable avec 63% de rendement global (**Entrée 3**). L'hétérogénéisation de ces systèmes dans la matrice mésoporeuse permet donc de conférer une activité catalytique sur des systèmes inertes de base. En revanche, les **CLEC NikA/Ni-EDTA** ont une réactivité très faible (9% de rendement global) attestant que la réaction passe par un mécanisme rédox (**Entrée 8**). Ces résultats permettent d'affirmer que la réactivité est dépendante du métal utilisé (Fe ou Ni) et des ligands qui l'entourent (EDTA, L1 ou L2).

Les rendements étant déjà excellents, diverses combinaisons de ratio catalyseur/substrat/oxydant/chlore ont été testées pour améliorer le nombre de TON ainsi que la chimiosélectivité en faveur de la chlorhydrine. Ces résultats ont été résumés dans la **Figure III-11**.

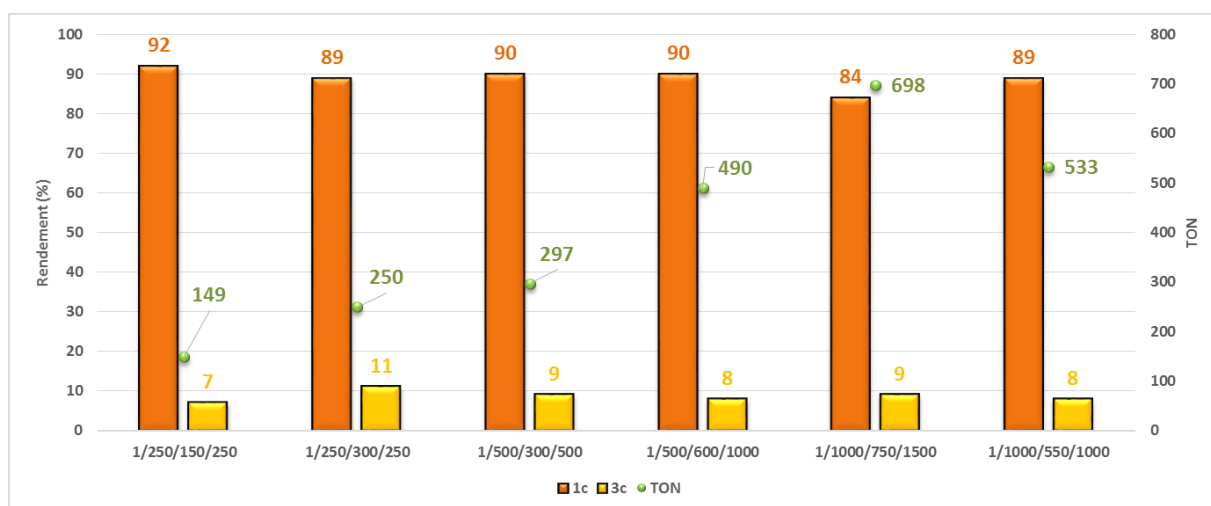


Figure III-11 : Catalyse d'hydroxychloration de l' α -méthylstyrène en présence des **CLEC NikA/Fe-L2** avec différents ratios catalyseur/substrat/Oxone/NaCl.

Premièrement, pour toutes les conditions testées, uniquement les **CLEC NikA/Fe-L2** possèdent une réactivité par rapport aux différents constituants du système pris séparément (complexe seul, hybride en solution). Deuxièmement, quelles que soient les conditions utilisées, les rendements et les sélectivités sont similaires. Les rendements oscillent entre 84 et 92% pour le produit **1c** et entre 7 et 11% pour le produit **3c**. Bien que le rendement soit légèrement inférieur, la condition 1/1000/750/1500 montre qu'il est possible d'atteindre un

TON voisin de 700 soit un TOF de 23,3 min⁻¹. Finalement, cette étude met en exergue la très haute efficacité du système avec des rendements, TON et TOF très élevés.

Pour la suite des expériences, deux conditions ont été choisies : (i) la condition 1/500/600/1000 pour l'expansion de la gamme de substrats et (ii) 1/1000/750/1500 pour les tests de stabilité et de recyclabilité. La première condition a été choisie parce qu'elle permet de convertir tout le substrat utilisé, d'obtenir un nombre de TON élevés (≈ 500 TON) et avec une très bonne sélectivité (≈ 90 % pour **1c**). La deuxième condition a été choisie parce qu'elle possède le plus grand nombre de cycles catalytiques (≈ 700 TON) et qu'elle est sous-stœchiométrique en oxydant (ce qui permet d'être moins destructeur vis-à-vis des CLEC).

5-2. Développement du système

5-2-1. Expansion de la gamme de substrats

La réactivité d'hydroxychloration a été réalisée sur une série d'alcènes en utilisant 100 CLEC NikA/Fe-L2 comme catalyseur, l'Oxone® comme oxydant et NaCl comme source de chlore avec un ratio catalyseur/substrat/oxydant/chlore de 1/500/600/1000. La réaction a été effectuée à température ambiante sous agitation pendant 30 minutes (**Schéma III-15**).

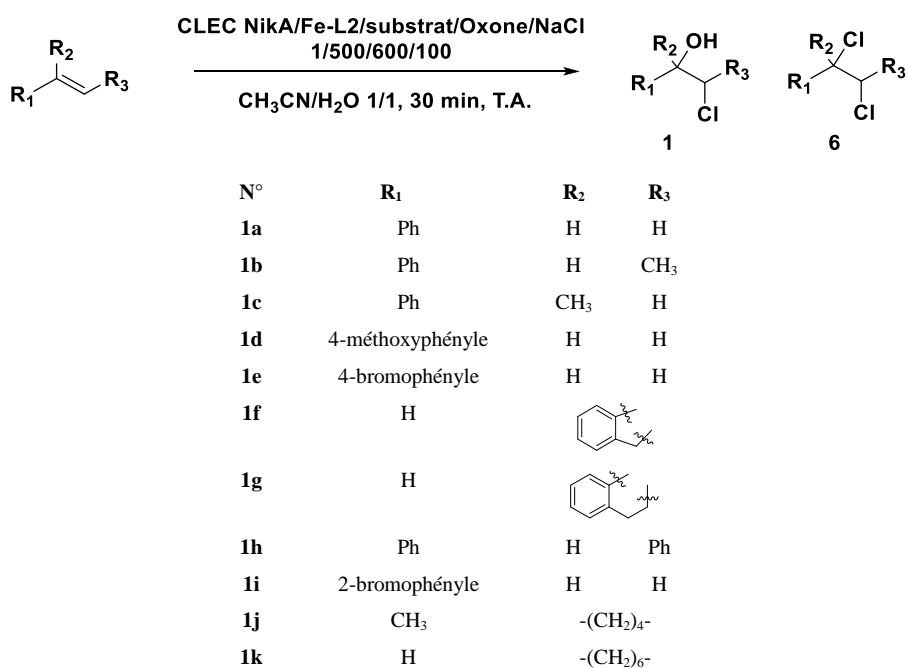




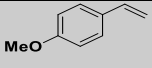

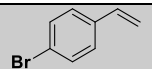

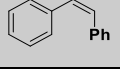
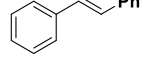



Schéma III-15 : Expansion de la gamme de substrats pour l'hydroxychloration d'alcènes.

Chapitre III : Développement d'une biocatalyse hétérogène

Pour la grande majorité des substrats testés, deux produits réactionnels sont obtenus : la chlorhydrine (**1**) et le produit dichloré (**6**) (**Tableau III-7**). La chlorhydrine est obtenue avec une régiosélectivité de type Markovnikov quel que soit le substrat de départ. La chimiosélectivité de la réaction est très variable avec une fluctuation allant de 29% à 100% en faveur du produit **1**. Dans seulement deux cas (*cis* et *trans*-stilbène), le produit majoritaire est le produit dichloré **6** (**Entrées 9 et 10**).

Tableau III-7 : Expansion de la gamme de substrats avec les CLEC NikA/Fe-L2.

Entrée	Substrat	Rendement (%) ^[a]	Sélectivité (%) ^[b]	TON ^[c]	Diastéréosélectivité ^[d]
1		98	92 ^[e]	490	-
2		63	86	365	-
3		75	79	375	1:1,7
4		72	91	360	3,1:1
5		96	100	480	-
6		23	83	115	-
7		4	100	20	-
8		97	100	485	100:0
9		41	29	205	nd
10		19	37	95	nd
11		5	100	30	-

^[a] Les rendements sont calculés à partir de la concentration en oxydant (750 équivalents). ^[b] produit **1** : produit **4**. ^[c] Nombre de TON globaux réalisés par le catalyseur. ^[d] Diastéréosélectivité entre **1** et **6**. ^[e] Sélectivité produit **1c** : produit **5c**.

Des substrats dérivés du styrène possédant un substituant électrodonneur, comme dans le cas du 4-méthoxystyrène, ont été transformés en chlorhydrines avec des rendements presque quantitatifs soit 480 TON (**Entrée 5**). En revanche, lorsque des substrats possédant des groupements électroattracteurs comme le 2- ou le 4-bromostyrène sont testés, la réactivité est

drastiquement diminuée avec des rendements globaux de 23 et 4%, respectivement (**Entrées 6 et 7**). Ces résultats semblent indiquer que la réactivité est favorisée dans le cas d'une double liaison enrichie en électrons, en ligne avec une addition électrophile. En conséquence, la réactivité sur des substrats aliphatiques comme le méthylcyclohexène est très faible (5% de rendement en **1j**) (**Entrée 11**).

Dans le cas du *trans*- β -méthylstyrène et du *cis*- β -méthylstyrène, la stéréoisomérie E/Z n'a aucun impact sur les rendements. Cependant la chimiosélectivité est différente (91% contre 79%, respectivement) (**Entrées 3 et 4**). Dans le cas du *trans*-stilbène et du *cis*-stilbène, la stéréoisomérie possède une forte influence à la fois sur les rendements et les sélectivités. Avec le *trans*-stilbène, rendement global de 19% seulement est obtenu avec une sélectivité de 37% en faveur de la chlorhydrine (**Entrée9**). Avec le *cis*-stilbène, les rendements sont meilleurs (41%) mais la sélectivité moins bonne (19%) (**Entrée10**). L'encombrement stérique possède donc un rôle non négligeable sur l'efficacité et la sélectivité de la réaction.

Un substrat en particulier a attiré notre attention, le 1,2-dihydronaphtalène. Avec ce substrat, la réaction est chimiosélective (100 % en faveur de la chlorhydrine), 100% diastéréosélective et 100% régiosélective. De plus, c'est le seul substrat à donner de l'excès énantiomérique (10%). Bien que faible, l'observation de cet excès énantiomérique montre qu'un substrat contraint peut conduire à une induction asymétrique par la protéine (**Entrée 8**).

5-2-2. Etudes de stabilité des CLEC NikA/Fe-Lx

Les études de stabilité des deux systèmes **CLEC NikA/Fe-Lx** ($x = 1$ ou 2) ont été comparées sur la réactivité d'hydroxychloration du 4-méthoxystyrène. Les conditions réactionnelles choisies sont un ratio catalyseur/substrat/oxydant/chlore de 1/1000/750/1500 à température ambiante sur des catalyses de 30 min (**Schéma III-16**). Le choix s'est porté sur le 4-méthoxystyrène puisque ce substrat possède une chimiosélectivité de 100% pour la chlorhydrine avec des rendements quasiment quantitatifs.

Ces études de stabilité se sont déroulées selon le mode opératoire suivant : un lot de 100 **CLEC NikA/Fe-Lx**, est mis en présence des différents réactifs afin de réaliser une première catalyse sur 30 min. Ensuite, ces CLEC sont lavés abondamment et le surnageant est enlevé.

Un 2^{ème} tour de catalyse est alors effectué en ajoutant les réactifs nécessaires pour la réaction. Ces différentes étapes sont alors répétées jusqu'au 13^{ème} tour de catalyse. Les résultats sont présentés sur la **Figure III-12**.

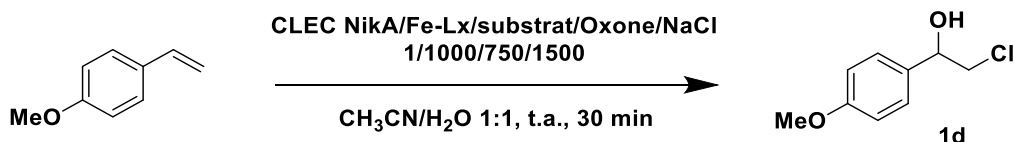


Schéma III-16 : Conditions réactionnelles pour les études de stabilité des CLEC NikA/Fe-Lx.

Lors de cette étude de stabilité, un comportement différent est observé pour les deux systèmes **CLEC NikA/Fe-L1** et **CLEC NikA/Fe-L2**. En effet, les **CLEC NikA/Fe-L1** conservent une activité catalytique totale sur 3 tours de catalyse (> 80% de rendement en **1d**, > 620 TON par tour) puis cette activité décroît rapidement à partir du 4^{ème} tour. Tout de même, environ 3200 TON ont pu être réalisés avec le même lot de **CLEC NikA/Fe-L1**. En comparaison, les **CLEC NikA/Fe-L2** conservent une activité catalytique complète sur 7 tours de catalyse (> 80% de rendement en **1d**, > 620 TON par tour) puis cette activité décroît progressivement permettant d'effectuer approximativement 6000 TON en 13 tours de catalyse. La moins bonne stabilité obtenue avec les **CLEC NikA/Fe-L1** peut s'expliquer par un ligand plus facilement oxydable ce qui le conduirait à sa dégradation.

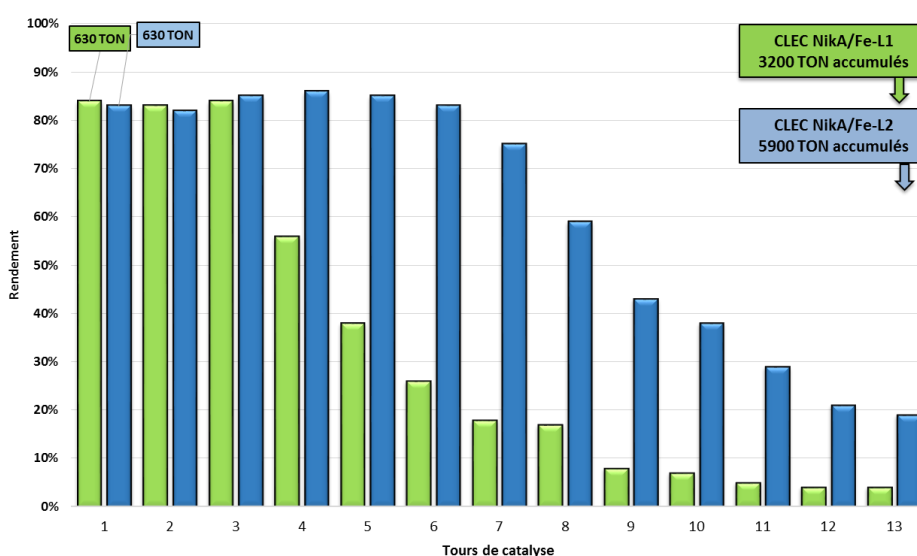


Figure III-12 : Comparaison des stabilités des CLEC NikA/Fe-L1 et CLEC NikA/Fe-L2 concernant la réactivité d'hydroxychloration.

Dans le cas des **CLEC NikA/Fe-L2**, la diminution de l'activité catalytique pourrait correspondre à la perte progressive du complexe au sein des CLEC. Afin de valider cette hypothèse, des études de spectrométrie de fluorescence X ont été réalisées sur les **CLEC NikA/Fe-L2** avant et après réaction (**Figure III-13**).

Le spectre avant catalyse montre la présence du fer au sein des cristaux (cristaux violet). En revanche, après 13 tours de catalyse en présence d'Oxone®, le spectre de fluorescence montre la perte quasi-totale du fer (cristaux jaune pâle). Cette étude permet de mettre en évidence la perte du fer au cours de la réaction d'hydroxychloration. En revanche, elle ne permet pas de discriminer si les CLEC perdent uniquement l'ion métallique ou le complexe **Fe-L2**.

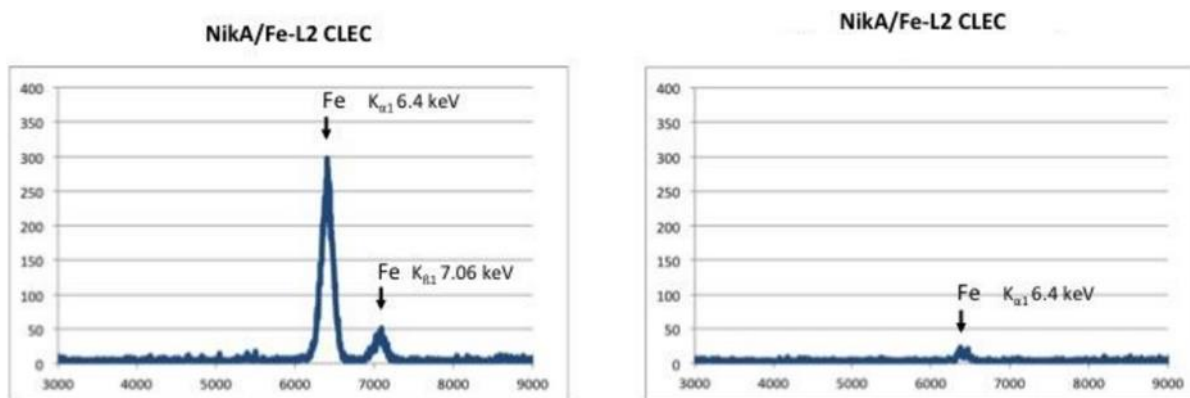


Figure III-13 : Spectres de fluorescence X des **CLEC NikA/Fe-L2** avant catalyse (à gauche) et après 13 tours de catalyse en présence d'Oxone® (à droite).

Pour répondre à cette problématique et améliorer la stabilité des systèmes CLEC, des expériences de trempage ont été effectuées. Pour cela, un excès de **FeCl₃** ou un excès de complexe **Fe-L2** ont été incubés avec la solution contenant les **CLEC NikA/Fe-L2** en cours d'utilisation. Ces incubations ont été réalisées après les tours 7, 9, 11 et 13 (**Figure III-14**).

Suite à l'incubation du complexe **Fe-L2** avec les **CLEC NikA/Fe-L2**, l'activité catalytique reste stable pendant 10 tours (au lieu de 7 pour le CLEC sans incubation) avec une légère diminution des rendements de 84 à 70%. Après 13 tours de catalyse, 6600 TON ont été réalisés soit une amélioration de 12% de l'activité catalytique des **CLEC NikA/Fe-L2**. En revanche, après 10 tours de catalyse, l'activité catalytique se dégrade rapidement attestant que les cristaux protéiques peuvent être abîmés lors de l'utilisation répétée de l'Oxone®. Suite à l'incubation du **FeCl₃** avec les **CLEC NikA/Fe-L2** après les tours 7, 9, 11 et 13, l'activité

catalytique est similaire (~ 5%) à celle obtenue sans l'incubation permettant d'atteindre 5300 TON après 13 tours de catalyse. Cette expérience permet d'affirmer que la diminution de l'activité catalytique des CLEC lors de la répétition des réactions de catalyse provient de la perte ou de la dégradation du complexe **Fe-L2**.

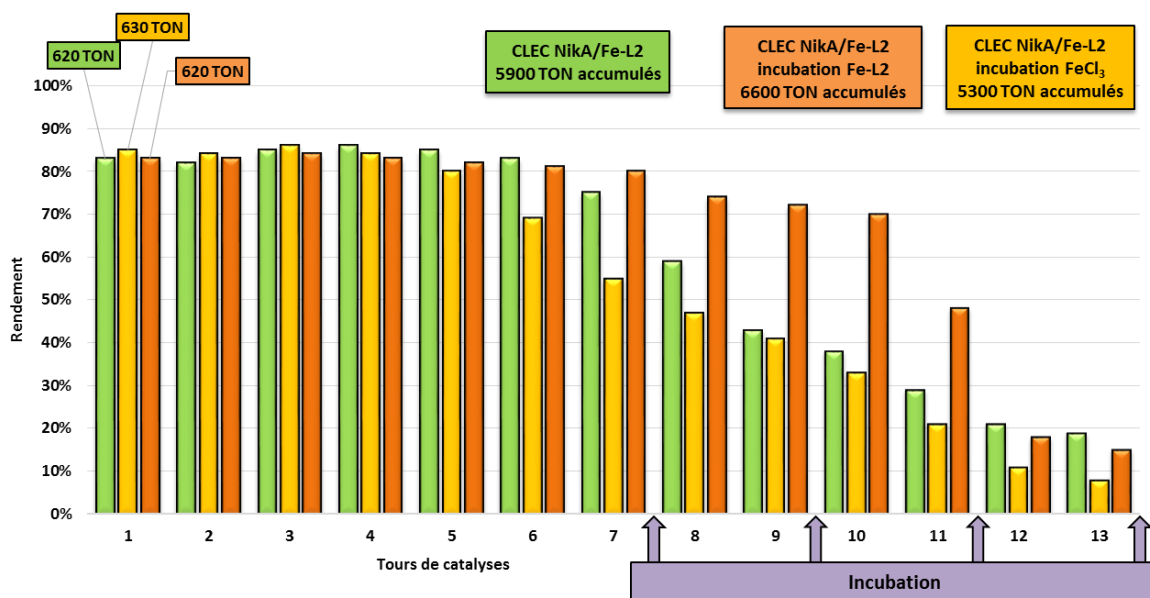


Figure III-14 : Etude de l'effet de l'incubation des CLEC NikA/Fe-L2 avec FeCl₃(jaune) ou Fe-L2 (orange) sur la stabilité. Incubation après les tours 7, 9, 11 et 13. Expérience sans rechargement (vert).

Ces études de stabilité ont permis de démontrer que les CLEC NikA/Fe-L2 pouvaient être recyclés sur plusieurs tours de catalyse afin d'atteindre 6000 TON même en présence d'un oxydant fort, l'Oxone®. La dégradation des CLEC est due à deux facteurs : (i) le relargage progressif ou la dégradation du complexe **Fe-L2** au cours des catalyses et (ii) la dégradation de la protéine probablement due aux diverses oxydations qu'elle subit. Le relargage du complexe **Fe-L2** peut être évité, sur les 10 premiers tours, grâce à l'incubation du complexe **Fe-L2** avec les CLEC. En revanche, la dégradation de la protéine est irréversible entraînant une perte d'activité totale au bout du 13^{ème} tour de catalyse. Une solution peut être envisagée : trouver un oxydant moins destructeur.

Afin de déterminer les propriétés catalytiques optimales des CLEC NikA/Fe-L2, des expériences à hautes températures (70°C) ont été menées sur l'hydroxychloration du 4-

méthoxystyrène. Dans un premier temps, les cinétiques du système à température ambiante et à 70°C ont été comparées (**Figure III-15**).

L'augmentation de la température de 20°C à 70°C conduit à une vitesse initiale 7 fois plus élevée (495 min⁻¹ vs 68 min⁻¹). En 3 min, la catalyse avec les CLEC à 70°C est terminée avec un rendement de 86% et une chimiosélectivité de 100% pour **1d** alors que la réaction non catalysée forme deux produits (**1d** et le diol correspondant) avec un rendement global de 14% et une chimiosélectivité de 79 % en faveur de **1d**.

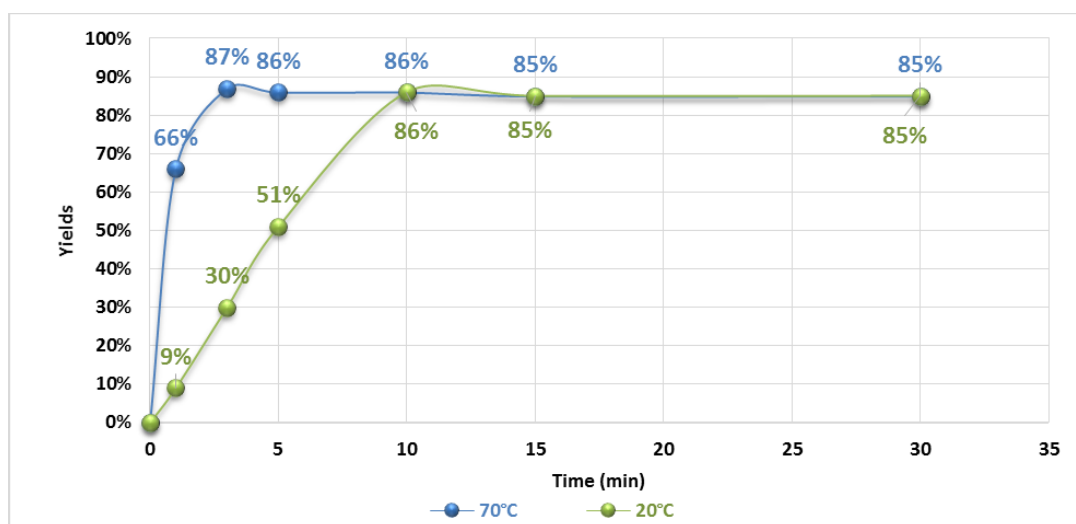


Figure III-15 : Cinétique de production de **1d** par les CLEC NikA/Fe-L2 à température ambiante et à 70°C.

Dans un second temps, l'intérêt s'est porté sur la stabilité du système à 70°C. Pour cela, la stabilité à 70°C des CLEC NikA/Fe-L2 a été comparée à celle obtenue à 20°C (**Figure III-16**). Les tours de catalyse ont été effectués dans les mêmes conditions réactionnelles que pour les CLEC à 20°C hormis le temps de catalyse qui a été réduit à 3 min. En comparaison avec le système CLEC à 20°C, les CLEC NikA/Fe-L2 à 70°C se dégradent plus rapidement : leur activité catalytique est préservée sur 3 tours de catalyse (au lieu de 7) puis l'activité décroît progressivement permettant d'obtenir 4500 TON accumulés au bout de 13 tours de catalyse (contre 5900 TON à 20°C).

La température a donc une influence sur la stabilité des CLEC. En revanche, il est important de noter qu'une catalyse d'oxydation efficace peut être réalisée avec des CLEC à 70°C. Ce système peut réaliser 650 TON en 3 min et plus de 4500 TON en 13 tours de catalyse avec

une cinétique extrêmement rapide (495 min^{-1}). Une fois de plus, les CLEC montrent leur grande stabilité vis-à-vis de conditions drastiques (solvant organique, haute température, pH et oxydant fort) avec une réactivité d'hydroxychloration efficace alors que le complexe seul ou l'hybride en solution ne possède aucune réactivité.

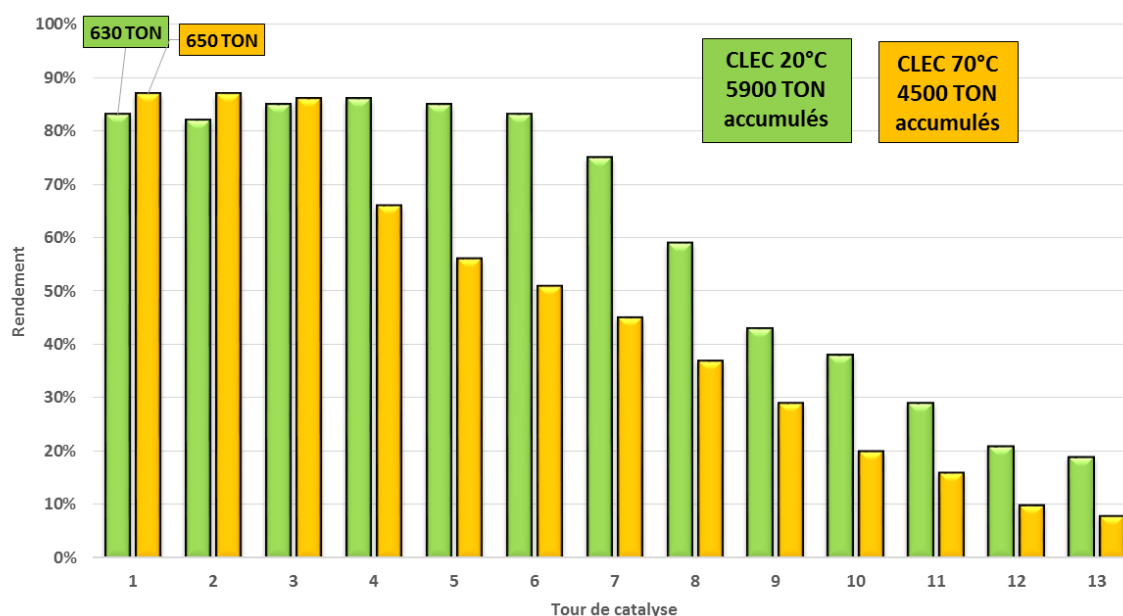
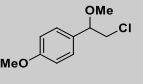
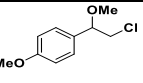
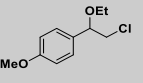
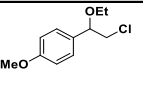
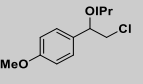
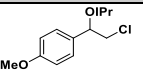


Figure III-16 : Etudes de stabilité des CLEC NikA/Fe-L2 à 20°C pendant 30 min (vert) et 70°C pendant 3 min (jaune).

Pour explorer toutes les capacités du système CLEC, des études sur l'insertion d'autres nucléophiles (autres qu' H_2O) ont été entreprises. Pour cela, la réaction d'hydroxychloration standard du 4-méthoxystyrène est réalisée dans une solution CH_3CN /alcool 1/1 afin d'obtenir les dérivés β -chloroéthers correspondants (Tableau III-8).

Les CLEC NikA/Fe-L2 catalysent l'insertion d'autres nucléophiles avec des résultats encourageants. En utilisant le méthanol, 27% de β -chloroéther correspondant sont obtenus avec une chimiosélectivité de 100% alors, qu'en absence de catalyseur, aucune réactivité n'est observée (Entrées 1 et 2). Lorsqu'un alcool plus encombré que le MeOH est utilisé, les rendements diminuent (24% pour l'éthanol et 9% pour l'isopropanol) et la chimiosélectivité de la réaction aussi (86% pour l'éthanol et 47% pour l'isopropanol) (Entrées 3 et 5). Ces expériences permettent d'ouvrir le champ des perspectives dans la fonctionnalisation d'alcènes.

Tableau III-8 : Insertion d'autres nucléophiles avec la réactivité d'hydroxychloration.

Entrée	Catalyseur	Alcool	β -chloroéther (%)	Rendement (%) ^[a]	Composé dichloré (%)
1	CLEC Nika/Fe-L2	MeOH		27	0
2	-	MeOH		1	3
3	CLEC Nika/Fe-L2	EtOH		24	4
4	-	EtOH		1	11
5	CLEC Nika/Fe-L2	IPrOH		9	10
6	-	IPrOH		0	12

^[a] Rendements obtenus pour un ratio catalyseur/substrat/oxydant/chlore de 1/500/600/1000. ^[b] Nombre de TON totaux réalisés par le catalyseur.

5-3. Etude du mécanisme réactionnel

Les résultats précédemment obtenus ont permis d'obtenir des informations concernant le mécanisme réactionnel. Dans un premier temps, nous savons que les chlorhydrines formées possèdent exclusivement une régiosélectivité Markovnikov. Dans un second temps, la réaction est de type « addition électrophile » puisque les substrats les plus réactifs sont ceux qui possèdent une double liaison enrichie en électrons (4-méthoxystyrène par exemple). De plus, la présence d'autres nucléophiles dans le milieu, comme des alcools, conduisent à la formation de β -chloroéthers. Finalement, cette réaction n'est réalisable qu'en présence de CLEC Nika/Fe-Lx et dépend du complexe inséré au sein des cristaux. L'activation de l'Oxone® (plus particulièrement du KHSO₅) est donc basée sur le métal.

A partir de ces premiers résultats, trois hypothèses peuvent être énoncées : (i) un mécanisme de type radicalaire, (ii) la formation d'un intermédiaire époxyde lié au métal qui serait ensuite ouvert par une attaque nucléophile d'un chlorure sur la position β ou (iii) la formation d'un intermédiaire de type « chloronium » suivie de l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur la position α .

Pour démontrer si le mécanisme réactionnel est de type radicalaire, deux expériences indépendantes ont été réalisées sur l'hydroxychloration du 4-méthoxystyrène : une expérience en présence d'un piègeur de radicaux et une autre en absence d'O₂ (**Schéma III-17** et **Tableau III-9**).

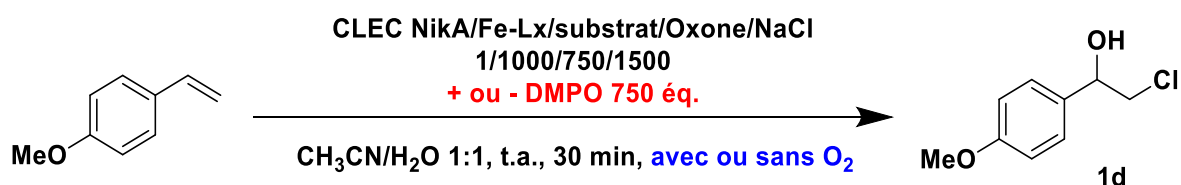


Schéma III-17 : Catalyse d'oxydation du 4-méthoxystyrène avec les CLEC NikA/Fe-L2 en présence ou en absence de DMPO et d'O₂.

En présence d'un piègeur radicalaire, le DMPO, l'activité catalytique d'hydroxychloration reste inchangée (**Entrée 2**) ce qui exclut la formation d'espèce de type Cl[•], SO₄[•] et OH[•] comme intermédiaires réactionnels.²¹⁵ Ces résultats peuvent être appuyés par l'expérience réalisée en absence d'O₂ en boîte à gants. En effet, la production de **1d** est similaire à celle obtenue dans les conditions standard ce qui permet d'affirmer que l'atome d'oxygène inséré ne provient pas d'O₂.

Tableau III-9 : Catalyse d'oxydation du substrat 4-méthoxystyrène avec les CLEC NikA/Fe-L2 dans différentes conditions.

Entrée	Conditions	Rendement 1d (%) ^[a]	TON ^[b]
1	Standard	85	630
2	+ DMPO	84	620
3	-O ₂	86	640

^[a] Les rendements sont calculés à partir de la concentration en oxydant (750 équivalents). ^[b] Nombre de TON globaux réalisés par le catalyseur.

Concernant la deuxième hypothèse suggérant le passage par un intermédiaire époxyde lié sur le métal, une expérience test a été réalisée pour déterminer si lors de l'ouverture d'un époxyde, la chlorhydrine pouvait être formée (**Schéma III-18**).

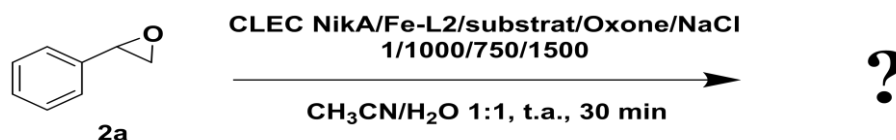


Schéma III-18 : Expérience test d'ouverture de l'époxyde **2a** par les **CLEC NikA/Fe-L2**.

Lors de cette catalyse réalisée sur l'oxyde du styrène, aucun produit réactionnel n'est formé que ce soit en présence des **CLEC NikA/Fe-L2**, du complexe **Fe-L2** ou en absence de catalyseur. Cette expérience justifie que le passage par un intermédiaire époxyde n'est pas envisageable pour cette réactivité.

Ces premiers résultats concernant le mécanisme réactionnel amènent à la troisième hypothèse, le passage par un intermédiaire de type chloronium. Pour valider ou non cette hypothèse, plusieurs expériences ont été entreprises. Une première expérience de marquage à l' H_2^{18}O consiste à réaliser la catalyse dans une solution $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2^{18}\text{O}$. Le but de cette expérience est de démontrer ou non l'insertion d'un hydroxyle marqué (**Schéma III-19**).

Lors de cette expérience, le produit **1d** est formé avec un rendement de 100% dont 85% d' ^{18}O ce qui indique le passage par un intermédiaire chloronium suivi d'une attaque nucléophile d'une molécule d'eau en position α du phényle. Concernant les 15% d' ^{16}O inséré, ils proviennent des solutions d'Oxone® et de NaCl qui n'ont pas été préparées dans H_2^{18}O . Ces résultats permettent d'expliquer la formation de chlorhydrines possédant la régiosélectivité Markovnikov. En effet, la chlorhydrine formée est issue de l'insertion d'une molécule d' H_2O sur le carbone le plus électrophile situé en position α du noyau aromatique. Finalement, la formation de produits dichlorés sur différents substrats testés lors des expériences de catalyse permet d'appuyer cette hypothèse (**Tableau III-7**). En effet, les ions chlorures présents dans le milieu pouvant également attaquer l'intermédiaire chloronium.

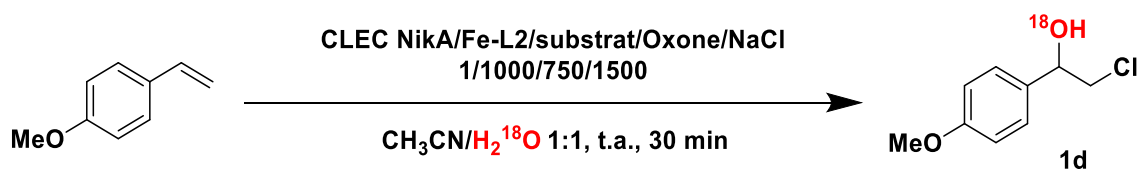


Schéma III-19 : Insertion d' H_2O^{18} pour la réactivité d'hydroxychloration du 4-méthoxystyrène par les **CLEC NikA/Fe-L2**.

D'après les premiers résultats, la première étape de la réaction est une addition électrophile sur la double liaison, conduisant à la formation d'un intermédiaire chloronium, suivie d'une attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur le carbone en position α du noyau aromatique. Suite à ces résultats, la formation de cet ion chloronium a été étudiée. Une des premières hypothèses énoncées serait la formation d'une espèce de type Fe(III)-OCl capable d'interagir avec la double liaison pour former l'intermédiaire chloronium. Pour cela, le complexe **Fe-L2** ancré dans les cristaux jouerait le rôle d'acide de Lewis en activant l'oxygène proximal du KHSO₅. Une attaque directe du Cl⁻ pourrait générer une espèce du type OCl⁻ soit libre dans le milieu réactionnel soit coordonné au métal. Pour valider ou non cette hypothèse, une catalyse standard a été réalisée sur le 4-méthoxystyrène en remplaçant l'Oxone® par le NaOCl (**Schéma III-20**).

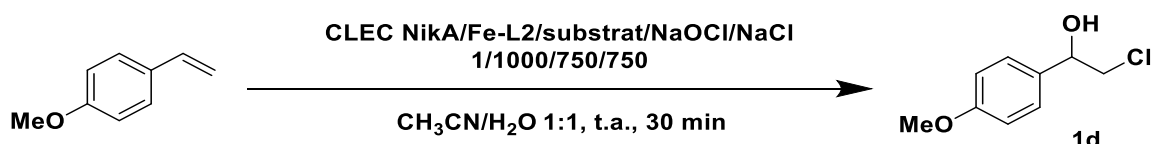


Schéma III-20 : Catalyse d'hydroxychloration standard en présence de NaOCl comme oxydant.

L'absence de réactivité lorsque le NaOCl remplace l'Oxone® réfute cette hypothèse. Les espèces Fe(III)-OCl ou OCl⁻ présentes dans le milieu ne peuvent interagir avec la double liaison pour former l'intermédiaire chloronium.

Une deuxième hypothèse énoncée serait la formation d'une espèce oxydante de type HOCl ou Cl₂ permettant de générer le chloronium. Des études complémentaires sur le pH de la réaction ont donc été entreprises. Pour cela, la réaction standard d'hydroxychloration du 4-méthoxystyrène avec un ratio catalyseur/substrat/Oxone®/NaCl 1/1000/750/1500 a été réalisée à différentes valeurs de pH (**Figure III-17**).

Dans les conditions catalytiques standard, la valeur de pH est très basse (2). Cette acidité est primordiale pour permettre une réaction d'hydroxychloration efficace. En effet, lors de l'augmentation de la valeur du pH, par ajout d'hydroxyde de sodium, la réaction est inhibée (25 % de rendement en **1d** à pH 6). Cette étude permet d'expliquer l'absence de réactivité avec NaOCl où le pH de la réaction était supérieur à 7.

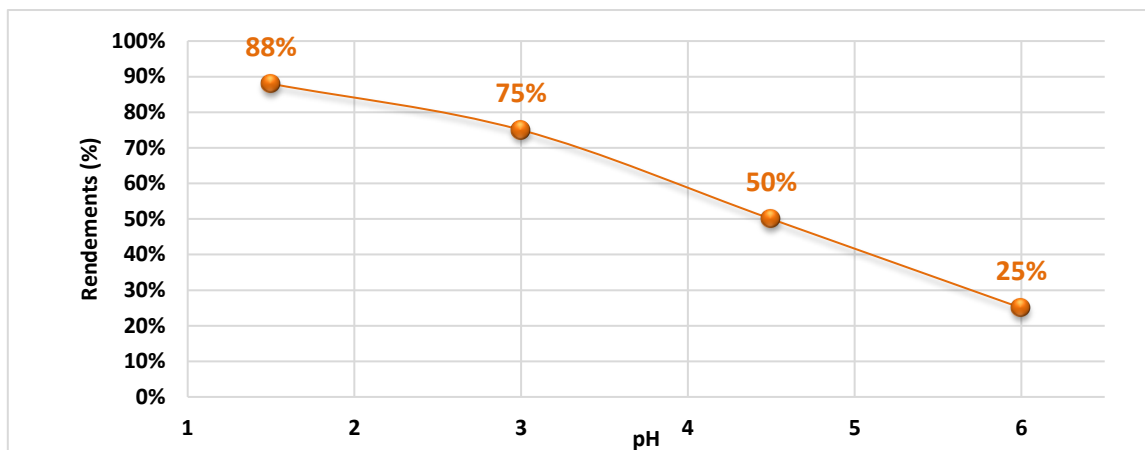


Figure III-17 : Variations du pH de la réaction d'hydroxychloration du 4-méthoxystyrène avec les CLEC Nika/Fe-L2.

Suite à ces résultats, nous nous sommes intéressés aux autres espèces chlorées susceptibles d'être présentes dans le milieu réactionnel à pH 2. D'après le diagramme de distribution à différents pH (Figure III-18), deux autres espèces apparaissent en conditions acides : Cl_2 et HOCl . Ces deux espèces sont susceptibles d'être des sources de chlore électrophile. D'après la Figure III-18, la réactivité est favorisée à des pH très bas amenant à émettre l'hypothèse que le Cl_2 serait l'espèce oxydante la plus active.

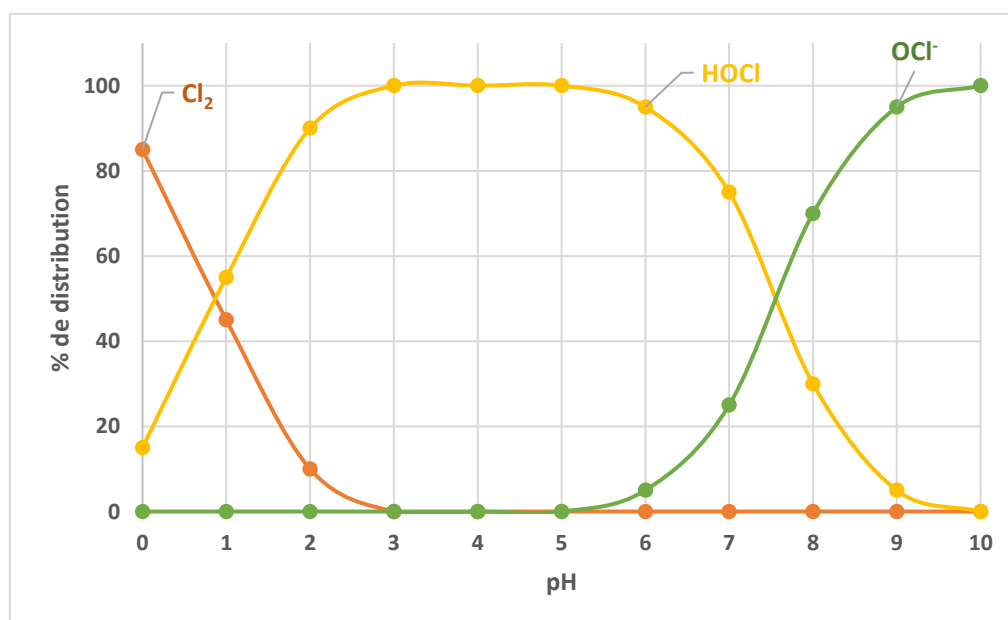


Figure III-18 : Pourcentage de distribution des espèces Cl_2 , HOCl et OCl^- libres en fonction du pH.

Pour valider cette hypothèse une expérience de spectroscopie UV-Visible permettant de déterminer l'espèce formée au cours du temps en présence d'Oxone et de NaCl a été réalisée. Dans les cas de l'Oxone® et du NaCl, la même bande d'absorption à 310 nm avec une absorbance très faible est observée (**Figure III-19**). Ce système est donc capable de former l'espèce active dans des concentrations minimales permettant une légère production de chlorhydrines (< 3%). Ce résultat montre l'importance de l'activation de l'Oxone® par les CLEC Nika/Fe-L2 pour qu'il puisse réagir avec les ions chlorures présents dans le milieu.

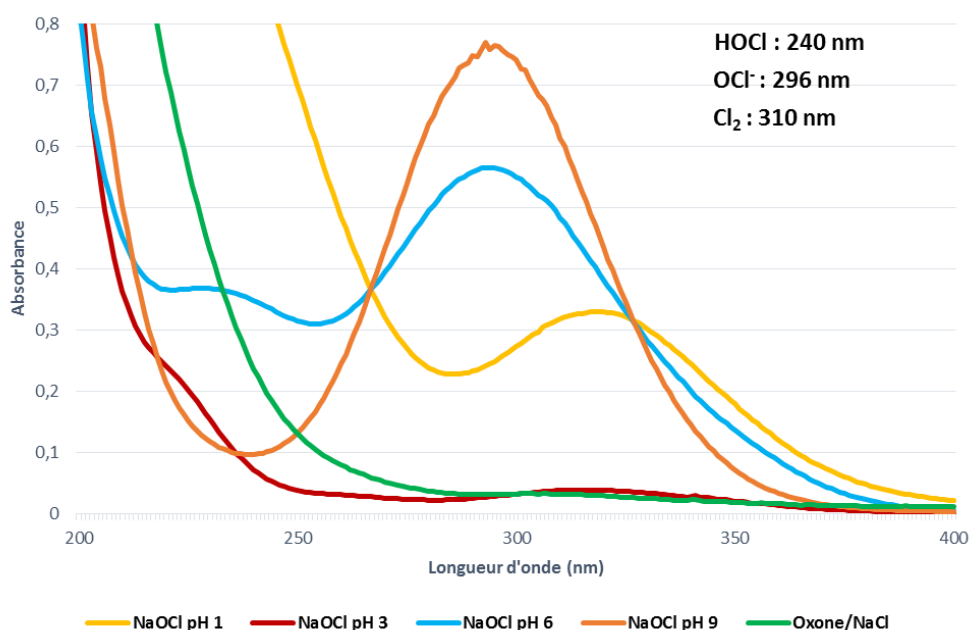


Figure III-19 : Spectroscopie UV-Visible du NaOCl à différents pH et du système Oxone/NaCl.

L'hypothèse la plus probante serait que les CLEC permettaient d'activer KHSO₅ lui permettant de réagir beaucoup plus rapidement avec les ions chlorures présents dans le milieu. Suite à cette réaction, Cl₂ pourrait être formé et réagir directement avec la double liaison de l'alcène. Avec la contrainte exercée par la protéine, de légers excès énantiomériques pourraient être observés sur un substrat rigide, comme le 1,2-dihydronaphtalène (**Schéma III-21**).

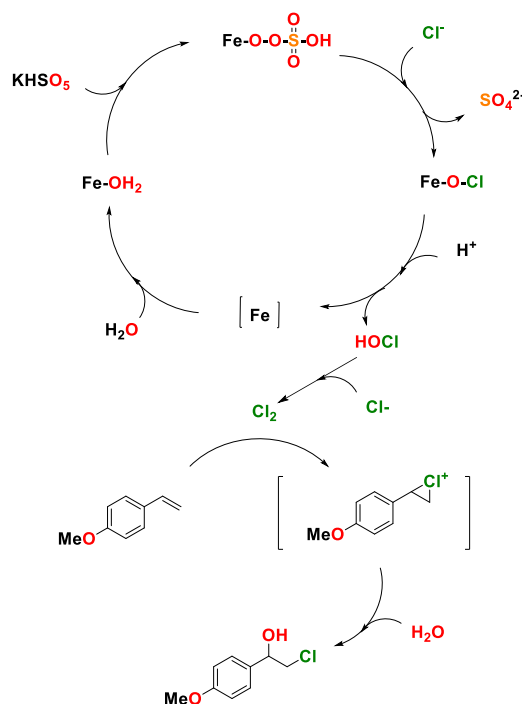


Schéma III-21 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des chlorhydrines. La protéine n'est pas représentée pour plus de clarté.

5-4. Conclusion

Dans cette partie, le but était de développer un nouveau système CLEC capable de réaliser des réactions d'oxydation en évitant d'utiliser un oxydant trop destructeur pour les cristaux comme le NaOCl. Pour cela, nous nous sommes d'abord intéressés à transposer la réactivité développée avec les hybrides en solution **Nika/Ru-bpza**, l'hydroxychloration d'alcènes. Afin d'utiliser un oxydant moins destructeur, des conditions réactionnelles ont été développées utilisant l'Oxone® et une source de chlore. Ces systèmes **CLEC Nika/Fe-Lx** ($x = 1$ ou 2) possèdent d'excellentes performances catalytiques comme une cinétique très rapide (68 min^{-1}), une excellente activité (jusqu'à 100% de rendement) et d'excellentes sélectivités avec une chimiosélectivité de 100% pour certains substrats, une régiosélectivité exclusivement Markovnikov et, concernant le 1,2-dihydronaphtalène, 100% de diastéréosélectivité et 10% d'excès énantiomérique. De plus, les systèmes en solution (complexe ou hybride) ne possèdent aucune réactivité intrinsèque et seule l'hétérogénéisation des systèmes grâce à l'emploi de cristaux de la protéine Nika stabilisés par la technologie CLEC permet d'obtenir une réactivité. Avec cette technologie, de nouvelles perspectives utilisant le système CLEC basé sur la protéine Nika sont ouvertes avec l'utilisation d'une plus large gamme de

Chapitre III : Développement d'une biocatalyse hétérogène

complexes afin d'élargir la gamme de réactions. Encore plus intéressant, cette hétérogénéisation a permis d'apporter un gain de stabilité très important avec la réutilisation des mêmes cristaux réticulés sur plusieurs tours d'affilés, l'utilisation de solvants organiques, de conditions très acides (pH 2) de conditions oxydantes et de températures élevées (70°C) conduisant à un système capable de réaliser pratiquement 7 000 TON avec une cinétique maximale de 500 min⁻¹. Pour finir, un mécanisme réactionnel a été proposé démontrant l'importance de l'activation du KHSO₅ par le métal dans la réactivité. Cette activation permettrait, en présence d'ions chlorure et de protons, de former une espèce oxydante active Cl₂ capable d'interagir avec la double liaison pour former un intermédiaire chloronium. Cet intermédiaire peut ensuite être ouvert par divers nucléophiles (eau ou alcools) afin de former des β-chlorhydrines ou des β-chloroéthers. Cette diversification de la fonctionnalisation de doubles liaisons est une nouvelle voie à explorer dans le futur.

6. Réactivité d'oxydation avec O₂

La preuve de concept de l'utilisation de la technologie CLEC sur nos cristaux de NikA étant faite, nous nous sommes intéressés à un nouveau challenge : l'activation d'O₂. En effet, à l'heure actuelle, il est difficile de développer des systèmes catalytiques efficaces et sélectifs capables de réaliser des réactions dans le cadre d'une chimie durable. Dans ce contexte, l'objectif était de développer une nouvelle réactivité d'oxydation avec les systèmes **CLEC NikA/Fe-Lx** (x = 0, 1 ou 2) en utilisant O₂ comme oxydant. Il a déjà été démontré par cristallographie que nos cristaux **NikA/Fe-Lx** (x = 0, 1) sont capables d'activer O₂ en présence d'un réducteur, le DTT. Cette étude prometteuse nous a donc amené à développer un système catalytique **CLEC NikA/Fe-Lx** où O₂ serait activé afin de transférer un ou deux atomes d'oxygène sur un substrat exogène possédant une double liaison carbone-carbone.

6-1. Oxydation du β-méthoxystyrène avec O₂

6-1-1. Comparaison de l'activité catalytique des CLEC NikA/Fe-L2, de l'hybride NikA/Fe-L2 en solution et du complexe Fe-L2 en solution

Les conditions réactionnelles mises au point pour l'hydroxychloration ont été testées en remplaçant l'Oxone® par le couple O₂/DTT sur l'oxydation du β-méthoxystyrène en présence des **CLEC NikA/Fe-L2** (Schéma III-22, Tableau III-10).

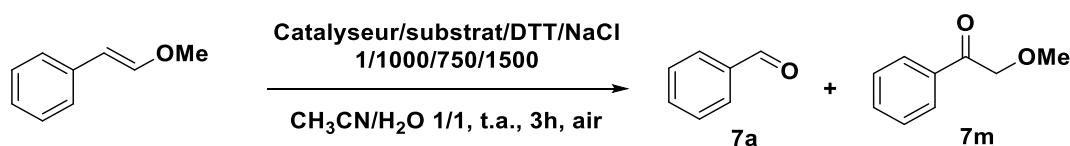


Schéma III-22 : Réaction d'oxydation du β-méthoxystyrène par O₂ avec différents types de catalyseurs (CLEC, hybride, complexe).

En remplaçant l'Oxone® par le couple O₂/DTT, la réaction d'hydroxychloration n'est plus réalisée. En effet, deux nouveaux produits réactionnels sont formés : le benzaldéhyde **7a**, résultant d'une réaction de coupure oxydante, et la 2-méthoxyacétophénone **7m**, résultant d'une oxydation de la liaison C-H en position α du phényle. En présence des **CLEC NikA/Fe-L2**, un rendement global de 74% et une chimiosélectivité de 51% en faveur de **7a**

sont obtenus (**Tableau III-10, entrée 1**) alors qu'en absence de catalyseur, aucune réactivité n'est observée (**Entrée 4**).

Tableau III-10 : Comparaison des différents types de catalyseurs sur l'oxydation du β -méthoxystyrène par O₂.

<i>Entrée</i>	Catalyseur	Rendement ^[a]	TON	Chimiosélectivité 7a : 7m
1	CLEC Nika/Fe-L2	74	555	51:49
2	Nika/Fe-L2 en solution ^[b]	17	128	65:35
3	Fe-L2	17	128	52:48
4	-	0	-	-
5	CLEC Nika/Fe-L2 ^[c]	75	563	50:50
6	CLEC Ni-EDTA	0	0	-
7	Ni-EDTA	0	-	-

^[a] Rendements totaux obtenus en **7a** et **7m**. ^[b] Réaction réalisée dans un mélange HEPES/Tris-HCl/CH₃CN de 88/7/5. ^[c] La réaction est réalisée en absence de chlore.

Comme le chlore n'est pas inséré dans les produits réactionnels, la même réaction a été réalisée en absence de chlorure (**Entrée 5**). Des résultats similaires ont été obtenus (75% de rendement global et une sélectivité de 50%) attestant que le chlore n'a aucune influence sur cette réactivité. La suite des expériences a donc été réalisée en absence de chlore.

Ensuite, l'activité catalytique des **CLEC Nika/Fe-L2** a été comparée à celles de l'hybride en solution ou du complexe seul. Pour que l'hybride en solution soit stable, la réaction a été réalisée dans le mélange HEPES/Tris-HCl/CH₃CN 88/7/5. En comparaison, l'hybride **Nika/Fe-L2** en solution ou le complexe **Fe-L2** possèdent une réactivité 4 à 5 fois plus faible avec 17% de rendement global et une chimiosélectivité similaire à celle obtenue avec les CLEC (**Entrées 2 et 3**).

Cette étude permet de démontrer que les **CLEC Nika/Fe-L2** sont capables d'activer O₂ et de transférer un atome d'oxygène à un substrat exogène avec une activité plus importante que pour les systèmes en solution. Cette amélioration de l'activité catalytique par les CLEC peut s'expliquer par la très forte concentration locale du biocatalyseur hétérogène contrairement à l'hybride en solution ou au complexe qui sont dispersés au sein de la solution. De plus,

l'utilisation du complexe **Ni-EDTA**,²¹⁶ au lieu de **Fe-L2** conduit à un **CLEC NikA/Ni-EDTA** complètement inactif (**Entrées 6 et 7**). En conséquence, l'efficacité des CLEC est liée à leur état cristallin et dépend du complexe inséré.

6-1-2. Etudes cinétiques des CLEC NikA/Fe-L2

Une étude cinétique de l'oxydation du β -méthoxystyrène par les **CLEC NikA/Fe-L2** en utilisant O_2 comme oxydant a été réalisée (**Figure III-20**). La catalyse d'oxydation a été effectuée dans les mêmes conditions réactionnelles que précédemment.

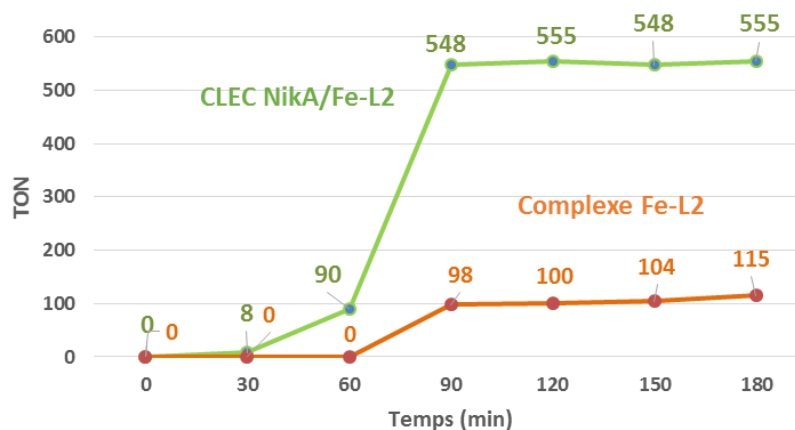


Figure III-20 : Cinétique de l'oxydation du β -méthoxystyrène par les **CLEC NikA/Fe-L2** et par le complexe **Fe-L2** en utilisant le couple O_2/DTT .

Cette courbe montre qu'au bout de 1h30 de catalyse, la réaction est terminée avec un maximum de 550 TON réalisés par le catalyseur. De plus, les courbes cinétiques des CLEC et du complexe révèlent une phase de latence d'environ 30-45 minutes qui correspondraient au temps nécessaire pour réduire une première fois l'ion métallique Fe(III) en Fe(II) par le DTT.

Pour valider cette hypothèse, la réduction du complexe de **Fe-L2** par le DTT a été étudiée par spectroscopie UV-Visible en boîte à gants (**Figure III-21**). Le complexe ayant un comportement similaire aux CLEC, il peut être utilisé comme témoin pour cette expérience.

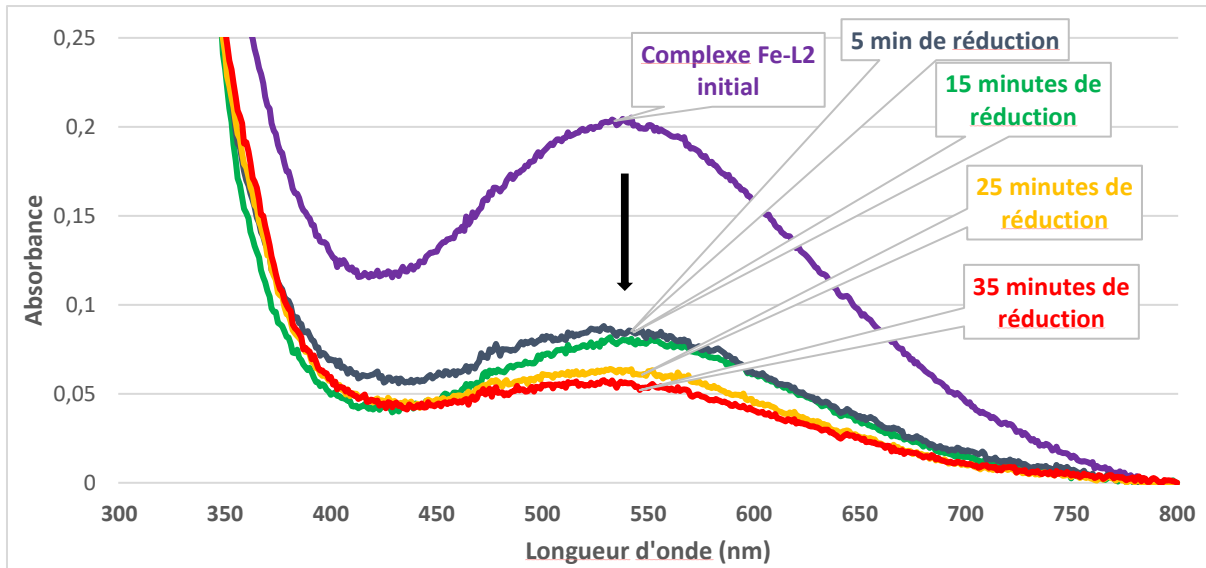


Figure III-21 : Cinétique de réduction du complexe **Fe-L2** par le DTT en boîte à gants.

Ces spectres UV-Visible montrent qu'au bout de 5 min, 50% de Fe(II) est formé. Ensuite, la réduction est très lente (25% de Fe(II) supplémentaire en 30 minutes). Ces résultats traduisent qu'une partie du complexe **Fe-L2** seulement est réduit pendant le temps de latence. Il est donc nécessaire d'atteindre une certaine concentration de Fe(II) pour que la réaction soit efficace. Cette réduction à un électron est donc l'étape limitante de la réaction. La pré-incubation des **CLEC Nika/Fe-L2** et du complexe **Fe-L2** avec le DTT en conditions anaérobies avant l'ajout du substrat pourrait permettre d'éliminer cette phase de latence (Figure III-22).

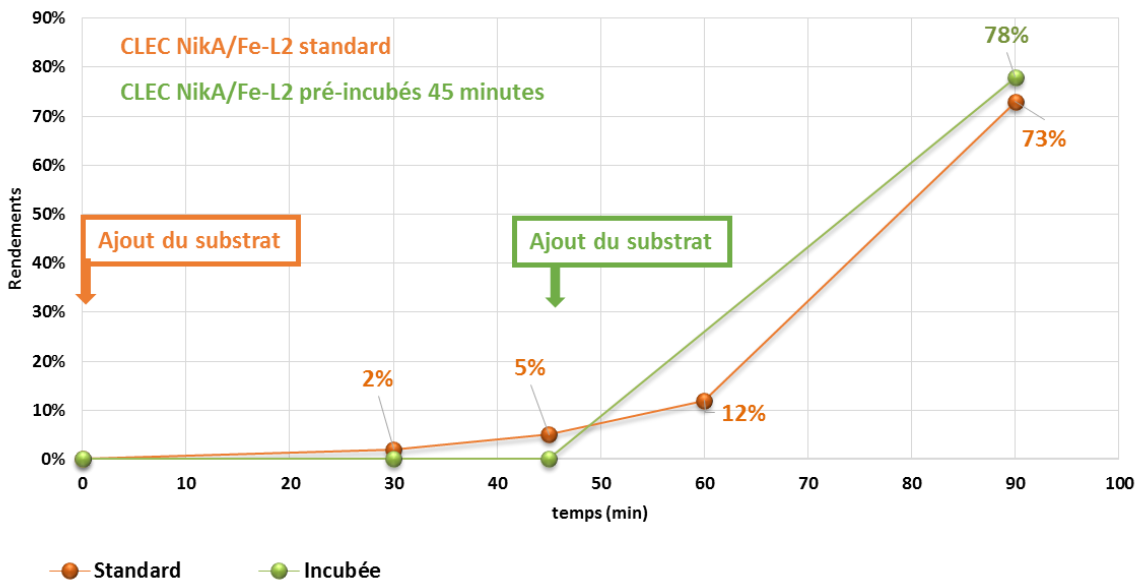


Figure III-22 : Comparaison des cinétiques d'oxydation du β -méthoxystyrène par les CLEC en conditions standard et les CLEC pré-incubés avec du DTT 45 minutes.

Pour cette expérience, les **CLEC NikA/Fe-L2** sont incubés en conditions anaérobies en boîte à gants avec 750 équivalents de DTT pendant 45 minutes. Puis, le milieu réactionnel est sorti de la boîte à gants et le substrat est ajouté. La catalyse est réalisée à l'air pendant 45 minutes et comparée à la cinétique standard. Pour l'expérience où les CLEC ont été incubés avec du DTT, un rendement de 78% est obtenu en seulement 45 minutes de réaction. La pré-incubation du catalyseur avec le DTT a donc permis de s'affranchir de la première étape limitante qui est la réduction du complexe **Fe-L2** par le DTT.

6-1-3. Comparaison de la stabilité des CLEC NikA/Fe-L2 vs l'hybride NikA/Fe-L2 en solution et le complexe Fe-L2 en solution

Après avoir comparé l'activité catalytique des différents types de catalyseur et déterminé la cinétique de la réaction, la stabilité des différents types de catalyseur (CLEC, hybride en solution et complexe) a été évaluée dans la solution standard de CH₃CN/H₂O 1/1 pour les **CLEC NikA/Fe-L2** et le complexe **Fe-L2** et le mélange HEPES/Tris-HCl/CH₃CN 88/7/5 pour l'hybride **NikA/Fe-L2**. Les expériences de catalyse ont été réalisées dans les conditions réactionnelles présentées **Schéma III-23** et les résultats sont présentés **Figure III-23**.

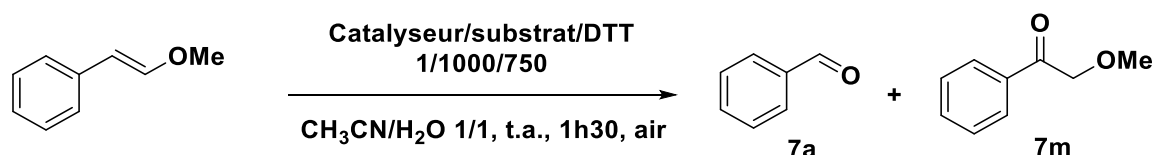


Schéma III-23 : Conditions réactionnelles pour un tour de catalyse pour l'oxydation du β -méthoxystyrène par différents catalyseurs.

L'activité catalytique de l'hybride **NikA/Fe-L2** en solution décroît drastiquement avec un maximum de 210 TON réalisés en 3 tours de catalyse. Le complexe **Fe-L2** est légèrement plus stable avec 540 TON réalisés en 6 tours de catalyse avant d'être totalement inactivé. En revanche, les **CLEC NikA/Fe-L2** conservent une activité catalytique maximale pendant au moins 50 tours successifs soit plus de 28 000 TON effectués au total.

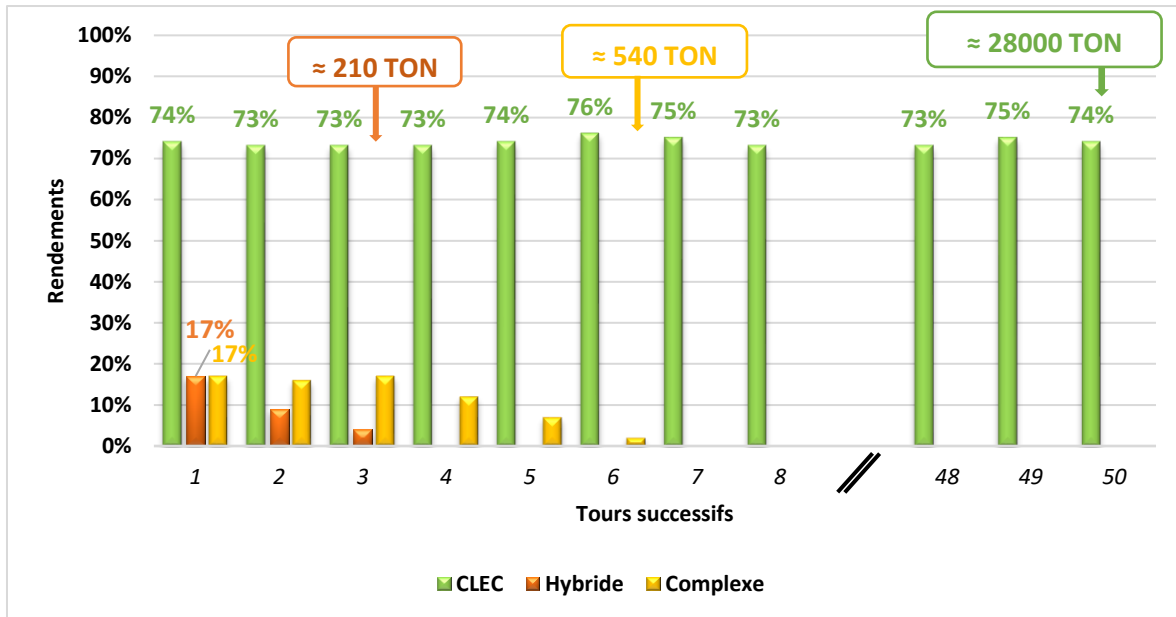


Figure III-23 : Comparaison des stabilités des différents catalyseurs sur l'oxydation du β -méthoxystyrène par O_2 .

Pour expliquer cette stabilité exceptionnelle du système **CLEC Nika/Fe-L2** sur cette réactivité, des études de caractérisation des CLEC ont été réalisées. Tout d'abord, une expérience de fluorescence X confirme qu'après 20 tours de catalyse, le complexe de fer est toujours présent dans le cristal (**Figure III-24**).

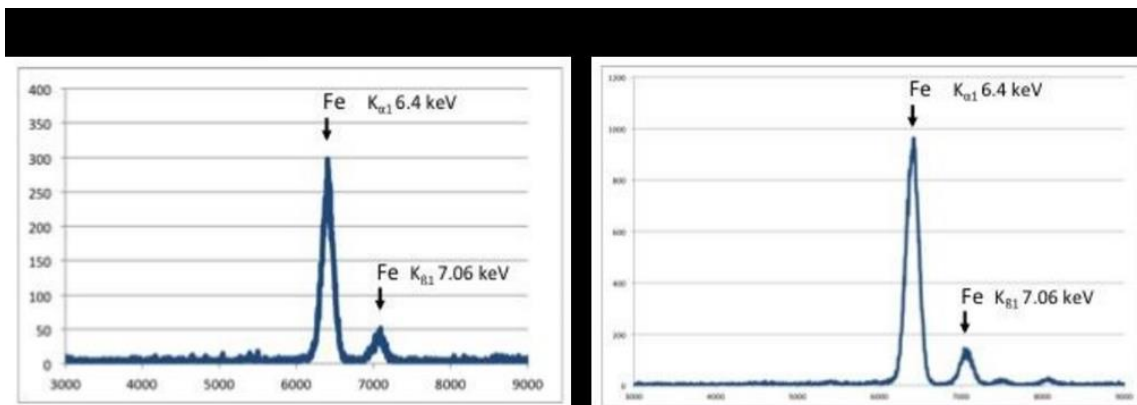


Figure III-24 : Spectres de fluorescence X sur un **CLEC Nika/Fe-L2**. a) avant catalyse. b) après 20 tours successifs sur la réactivité O_2/DTT .

L'étude par fluorescence X étant seulement qualitative, un dosage en fer a été réalisé sur 100 **CLEC Nika/Fe-L2** après 10 tours de catalyse. Un ratio de 0,94 fer/protéine a été déterminé démontrant qu'au fil des catalyses le complexe de fer n'est pas relargué. Afin d'appuyer un

peu plus ces résultats, une étude cinétique des CLEC **NikA/Fe-L2** a été réalisée après 40 tours de catalyse (**Figure III-25**).

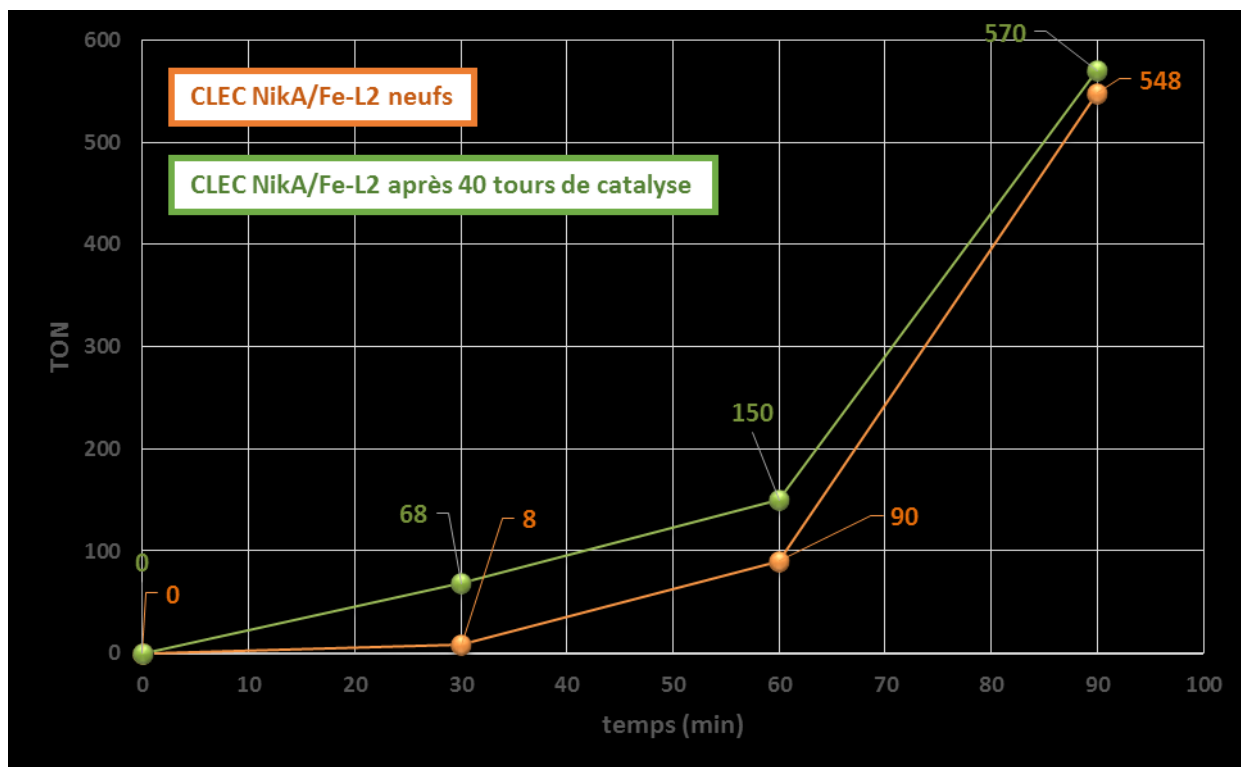


Figure III-25 : Cinétique de l'oxydation du β -méthoxystyrène par O_2/DTT avec des CLEC **NikA/Fe-L2** ayant effectué 40 tours de catalyse.

Ces deux courbes de cinétique sont globalement similaires avec une activité catalytique légèrement supérieure pour les CLEC après 40 tours de catalyse attestant que les CLEC **NikA/Fe-L2** n'ont rien perdu en activité et possède toujours leur complexe de fer actif.

Les propriétés catalytiques des CLEC **NikA/Fe-L2** pour l'oxydation du β -méthoxystyrène en présence d' O_2 sont vraiment remarquables avec une efficacité et une stabilité supérieures à la plupart des catalyseurs homogènes développés en oxydation et rejoignent les efficacités catalytiques d'enzymes naturelles.

6-1-4. Comparaison des stabilités des CLEC **NikA/Fe-Lx** ($x = 0, 1$ ou 2)

D'après les études cristallographiques des différents hybrides de **NikA/Fe-Lx** en présence d' O_2/DTT (en absence de substrat exogène), chaque hybride possède un comportement

différent vis-à-vis de l'oxydation. Le complexe **Fe-L0** est doublement hydroxylé au niveau de son ligand benzyle avec la formation d'un produit catéchol qui sature la sphère de coordination du fer, le rendant inactif, le complexe **Fe-L1** est hydroxylé en position α du ligand phénol et le complexe **Fe-L2** ne subit aucune oxydation sur son ligand. Ces résultats semblent indiquer que le complexe **Fe-L2** serait plus stable que le complexe **Fe-L1**, lui-même plus stable que le complexe **Fe-L0**. Pour évaluer cette hypothèse, des études comparatives de stabilité ont été réalisées avec les différents systèmes **CLEC NikA/Fe-Lx** (Figure III-26).

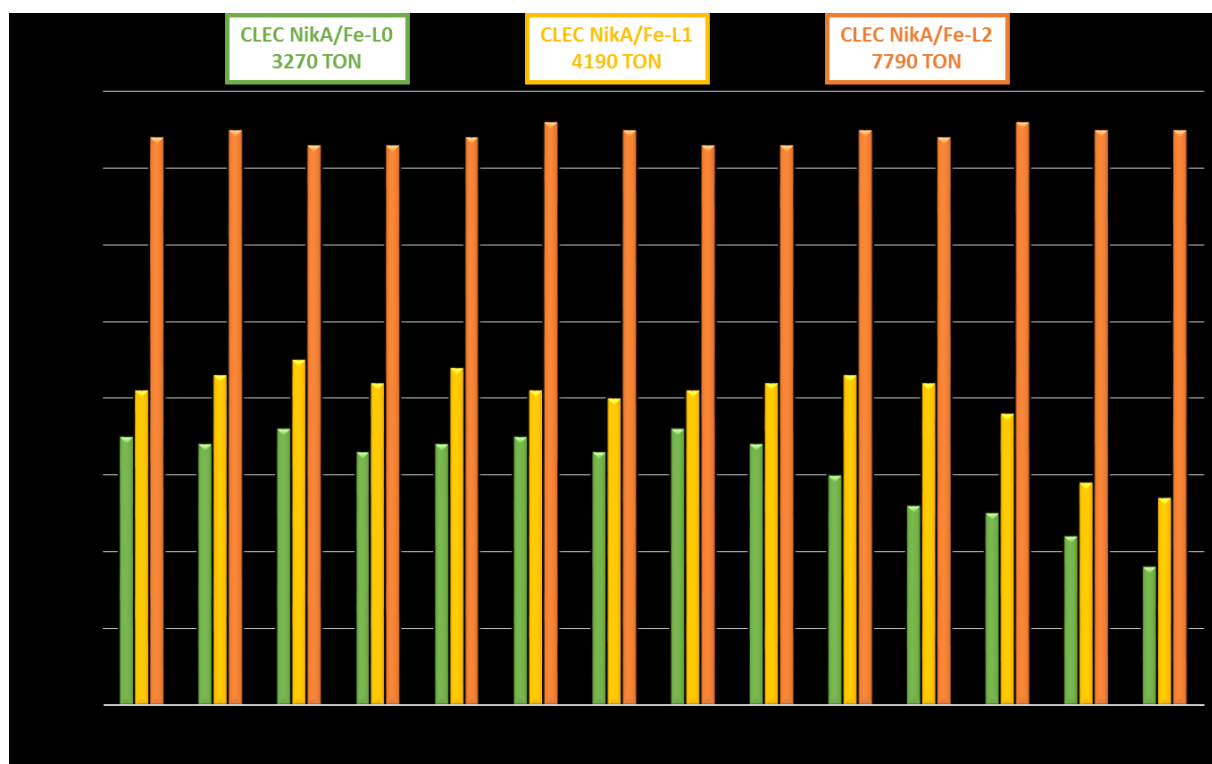


Figure III-26 : Comparaison des stabilités des trois **CLEC NikA/Fe-Lx**.

Dans tous les cas, les **CLEC NikA/Fe-Lx** possèdent une activité catalytique plus importante que les complexes seuls. Les **CLEC NikA/Fe-L0** atteignent un rendement global de 35% et une chimiosélectivité de 50% alors que le complexe seul atteint 4% de rendement et 52% de sélectivité en faveur de **7a**. Dans le cas de l'utilisation de L1, la tendance est la même avec un rendement de 43% et une sélectivité de 50% pour les CLEC contre 8% de rendement et une sélectivité de 55% pour **7a** pour le complexe seul. Il est intéressant de constater que le complexe **Fe-L0** ou les **CLEC NikA/Fe-L0** possède une activité catalytique alors que lors des études cristallographiques, la sphère de coordination du fer est saturée après seulement 2 TON. Pour expliquer cela, deux hypothèses peuvent être formulées : soit la réaction sur le substrat exogène serait favorisée, par rapport à la dihydroxylation aromatique

intramoléculaire, soit les conditions réactionnelles (solvants, etc...) permettent de limiter l'oxydation du ligand.

Dans un second temps, chaque CLEC possède une activité catalytique différente. En effet, les rendements globaux obtenus avec les **CLEC NikA/Fe-L2** sont deux fois supérieurs aux autres systèmes (75% pour **CLEC NikA/Fe-L2** vs 35% et 40% pour **CLEC NikA/Fe-L0** et **CLEC NikA/Fe-L1**, respectivement). Ce premier résultat démontre que, comme dans le cas de l'hydroxychloration d'alcènes, la réaction catalytique est centrée sur le complexe de fer inséré au sein des cristaux.

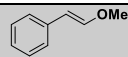
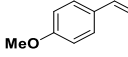
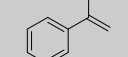
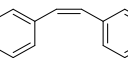
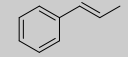
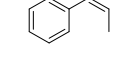
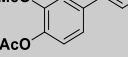
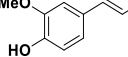
Dans un troisième temps, ce diagramme démontre que la stabilité est très différente en fonction du complexe utilisé. Les trois systèmes sont réutilisables pendant plusieurs tours. Toutefois, l'activité catalytique des **CLEC NikA/Fe-L0** et **CLEC NikA/Fe-L1** décroît progressivement à partir du 8^{ème} et du 12^{ème} tour, respectivement, permettant d'atteindre, tout de même, 3270 TON et 4190 TON en 14 tours de catalyse. Contrairement aux deux systèmes précédents, les **CLEC NikA/Fe-L2** peuvent atteindre 7790 TON en 14 tours de catalyse sans aucune perte d'activité. L'optimisation des ligands est donc primordiale pour l'amélioration des activités catalytiques ou des stabilités des systèmes. Les différentes expériences de catalyse qui suivent ont donc été réalisées avec les **CLEC NikA/Fe-L2**.

6-2. Expansion de la gamme de substrats

La gamme de substrats a ensuite été étendue à des alcènes (**Tableau III-11**). Avec ces substrats, uniquement des produits issus de la coupure oxydante de la double liaison alcène ont été obtenus avec des chimiosélectivités de 100% pour chacun des substrats (pas de formation de cétone résultant d'une autre réaction d'oxydation). Ces résultats indiquent que cette réactivité est une oxydation à 4 électrons. Avec les **CLEC NikA/Fe-L2**, les rendements obtenus oscillent entre 0% et 52% alors que l'hybride **NikA/Fe-L2** et le complexe **Fe-L2** conduisent à des rendements inférieurs à 6% quel que soit le substrat testé. L'allongement de la durée de la réaction, dans le cas du 4-méthoxystyrène et de l' α -méthylstyrène, permet d'augmenter les rendements jusqu'à 51% et 27%, respectivement. En revanche, la réaction n'est pas totale à cause de l'oxydation du DTT par O₂ au cours du temps.

D'après les résultats obtenus, la réactivité de la double liaison dépend de deux paramètres : (i) l'effet électronique des différents substituants et (ii) l'encombrement stérique. La présence d'un ou plusieurs groupements électrodonneurs conduit à des rendements supérieurs (**Entrées 1 et 7**). Il est donc nécessaire que le substrat soit activé pour que la réaction fonctionne. Comme pour l'hydroxychloration, la réactivité de la double liaison en présence du couple O₂/DTT correspond à une addition électrophile. De plus, en fonction de la position du groupement méthyle en position α ou β , les rendements sont très différents (**Entrées 3, 6 et 7**) attestant de l'importance du rôle de l'encombrement stérique sur l'activité catalytique.

Tableau III-11 : Expansion de la gamme de substrat avec les **CLEC NikA/Fe-L2**.

Entrée	Substrat	Aldéhyde ^[a] (%)	Cétone ^[a] (%)	TON ^[b]
1		38	36	550
2		26(51 ^[c])	0	200
3		0	7(27 ^[c])	50
4		22	0	170
5		2	0	15
6		0	0	0
7		52	0	390
8		2	0	15

La catalyse est réalisée dans le mélange HEPES/Tris-HCl/CH₃CN 88/7/5. ^[a] Rendements calculés à partir des 750 éq. de DTT. ^[b] Erreurs évaluées à 14% (voir partie expérimentale). ^[c] Rendements après 24 h de réaction.

Entre l'acétate d'isoeugénol et l'isoeugénol, les rendements obtenus sont complètement différents (52% et 2%, respectivement) (**Entrées 7-8**). Pourtant, leurs propriétés électroniques et stériques sont assez similaires. Une des raisons qui pourrait expliquer l'absence de réactivité de l'isoeugénol est la présence du groupement phénol qui pourrait se lier sur le complexe métallique et inhiber totalement la réactivité par saturation de la sphère de coordination du métal.

Lors de cette catalyse, les **CLEC NikA/Fe-L2** permettent d'oxyder un plus grand nombre de substrats que l'hybride en solution ou que le complexe seul, qui sont capables uniquement d'oxyder le β -méthoxystyrène et le 4-méthoxystyrène.

6-3. Mécanisme réactionnel

D'après les données précédentes, trois caractéristiques importantes ont pu être dégagées pour le mécanisme réactionnel : (i) il est basé sur le métal, (ii) il résulte d'une addition électrophile et (iii) il commence par une étape de réduction du Fe(III) en Fe(II).

La première question à laquelle nous souhaitons répondre était : d'où provient l'atome d'oxygène inséré dans la double liaison des alcènes ? Deux expériences de catalyse ont donc été réalisées : (i) en utilisant $H_2^{18}O$ et (ii) en absence d' O_2 . Une première catalyse d'oxydation a été réalisée sur le β -méthoxystyrène, en présence des **CLEC NikA/Fe-L2** dans une solution $CH_3CN/H_2^{18}O$. Lors de cette catalyse, aucun des deux produits (aldéhyde ou cétone) n'a été marqué indiquant que l'oxygène inséré dans la double liaison proviendrait d' O_2 . Pour appuyer ces résultats, une deuxième catalyse d'oxydation a été réalisée sur le même substrat, en conditions anaérobies, et aucun produit réactionnel n'a été formé. Ces deux résultats permettent de conclure qu' O_2 est bien la source d'oxygène de la réaction.

Dans un second temps, l'influence de la quantité de DTT sur la réactivité a été étudiée. En effet, il est primordial d'utiliser le DTT pour réduire les **CLEC NikA/Fe(III)-L2** au degré d'oxydation +II, nécessaire pour activer O_2 . En revanche, le DTT est-il également nécessaire à chaque cycle catalytique effectué par le catalyseur ? Pour répondre à cette question, une expérience de catalyse a donc été réalisée en présence des **CLEC NikA/Fe-L2** pour l'oxydation du β -méthoxystyrène. Différents ratios CLEC/substrat/DTT ont été testés en variant la concentration de DTT (**Figure III-27**). Les rendements varient entre 78% et 100%. Pour chaque réaction, le DTT est quasiment totalement consommé pour conduire au produit de la réaction. Une corrélation directe peut donc être faite entre le nombre de TON réalisés par le catalyseur et le nombre d'équivalents de DTT, avec un facteur de corrélation proche de 1. Cette expérience démontre que la réactivité est réducteur-dépendante c'est-à-dire que les deux électrons du DTT sont utilisés pour chaque cycle catalytique.

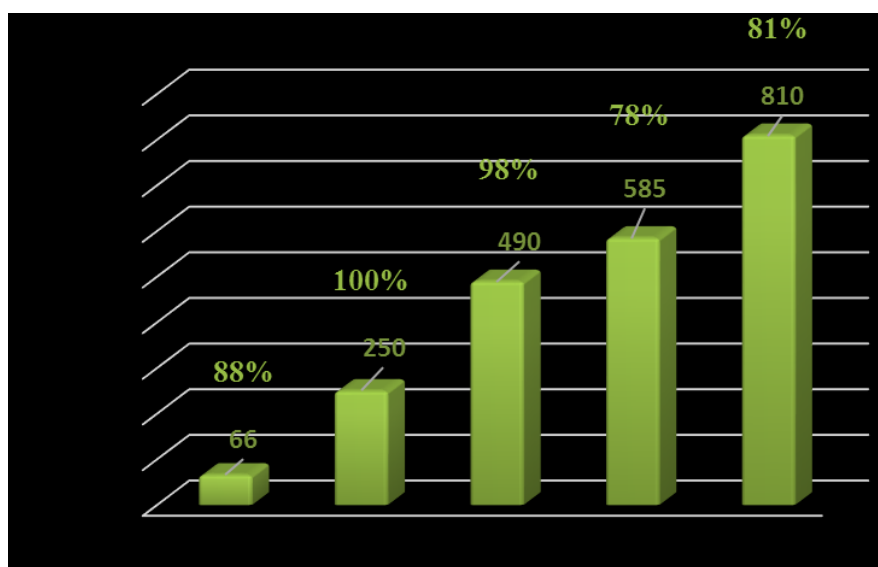


Figure III-27 : Variations des TON en fonction du ratio CLEC/substrat/DTT pour l'oxydation du β -méthoxystyrène.

Les produits oxydés, aldéhyde ou cétone, peuvent être formés *via* le passage par divers intermédiaires réactionnels. Différents intermédiaires possibles ont donc été testés dans les conditions standard d'oxydation par le couple O_2 /DTT en présence des CLEC NikA/Fe-L2 (Schéma III-24).

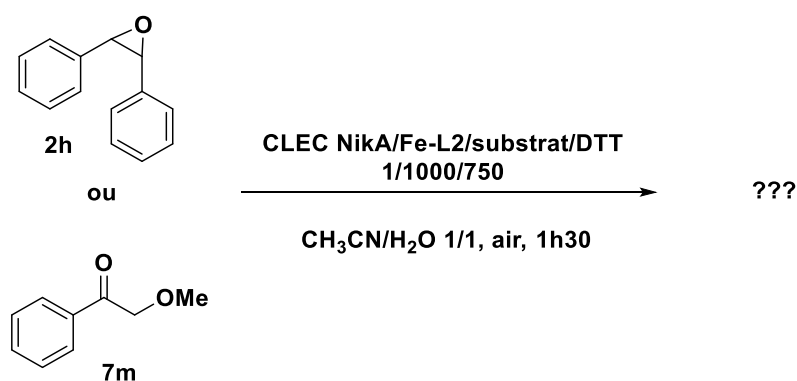


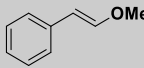

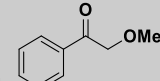
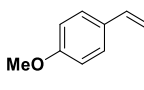
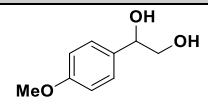
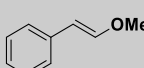

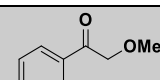
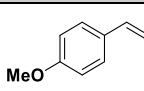
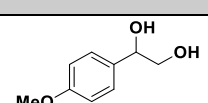
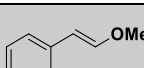

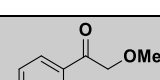
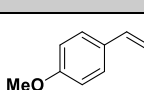
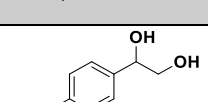
Schéma III-24 : Catalyse d'oxydation par les CLEC NikA/Fe-L2 de potentiels intermédiaires réactionnels.

Pour les substrats de type alcène, la catalyse d'oxydation a été étudiée sur un intermédiaire de type époxyde (2h). Pour le β -méthoxystyrène, le produit réactionnel 7ma été testé en catalyse mais aucun produit réactionnel n'est formé et le substrat est entièrement retrouvé.

Après la détermination des rôles de chaque réactif dans la réactivité ainsi que l'élimination de certaines hypothèses sur les intermédiaires réactionnels, deux nouvelles questions se posent : quelle est l'espèce oxydante de la réaction ? Est-elle identique dans la catalyse d'oxydation des alcènes et de l'éther d'énol ? Une fois le complexe réduit au degré d'oxydation +II, l'étape suivante serait l'activation d'O₂. D'après de nombreuses études réalisées sur les oxygénases et sur les complexes bio-inspirés, cette activation entraîne la formation d'un intermédiaire de type Fe(III)-superoxo, une espèce radicalaire.^{20, 57, 77} De ce fait, des expériences de catalyse en présence d'un piègeur radicalaire, le DMPO, ont été réalisées sur l'oxydation du β-méthoxystyrène et du 4-méthoxystyrène par les **CLEC NikA/Fe-L2**. En présence de 750 équivalents de DMPO, l'activité catalytique est pratiquement inhibée (4% et 5%, respectivement). Ces résultats démontrent que cette réaction implique des radicaux. En revanche, aucune espèce du type DMPO-OH• ou DMPO-OOH• n'a pu être identifiée par RPE suggérant l'absence de radicaux libres durant la catalyse.

Pour obtenir plus d'informations sur le mécanisme réactionnel de cette oxydation et sur l'espèce oxydante formée, O₂ a été remplacé par l'Oxone® pour effectuer la catalyse d'oxydation du β-méthoxystyrène et du 4-méthoxystyrène dans les conditions standard (**Tableau III-12**). Trois différences majeures sont à souligner lors du remplacement d'O₂ par l'Oxone® : (i) les rendements et sélectivités obtenus avec les **CLEC NikA/Fe-L2**, (ii) la différence de réactivité en fonction du substrat de départ et (iii) la différence de réactivité en absence de CLEC. Concernant la première différence, bien que les mêmes produits **7a** et **7m** aient été obtenus, un rendement global de seulement 54% a été atteint avec une chimiosélectivité légèrement différente de 61% en faveur de l'aldéhyde (contre 78% de rendement et 51% de chimiosélectivité avec le couple O₂/DTT) (**Entrée 1**). De plus, lors de la catalyse d'oxydation du 4-méthoxystyrène avec l'Oxone®, un nouveau produit réactionnel est formé, le 1-(4-méthoxyphényl)éthane-1,2-diol avec un rendement de 15% (**Entrée 2**). Ces deux résultats traduiraient un mécanisme réactionnel différent en fonction de l'oxydant ou du substrat utilisé. Finalement, une autre différence majeure est observée lors des catalyses d'oxydation par l'Oxone® en absence de catalyseur. Pour l'oxydation du β-méthoxystyrène, le produit **7m** est formé, avec un rendement de 28% contrairement au couple O₂/DTT (**Entrée 5**). Ce dernier résultat confirme que l'Oxone® et le couple O₂/DTT ont un comportement très différent sur l'oxydation de ce type de substrat.

Tableau III-12 : Catalyse d'oxydation du β -méthoxystyrène et du 4-méthoxystyrène avec KHSO_5 .

Entrée	Catalyseur	Substrat	Produit(s)	R (%)	Sélectivité ^[a]
1	CLEC NikA/Fe-L2		 + 	33 + 21	61:39
2				15	100:0
3	Fe-L2		 + 	16 + 23	41:59
4				12	100:0
5	-		 + 	7 + 28	20:80
6				17	100:0

^[a]Pour le β -méthoxystyrène, 7a : 7m et pour le 4-méthoxystyrène, diol : époxyde.

Ensuite, des études plus poussées ont été effectuées pour déterminer le mécanisme réactionnel de la formation des produits pour la catalyse d'oxydation avec l'Oxone®. Pour la réactivité obtenue avec le 4-méthoxystyrène, deux expériences de catalyse ont été réalisées : (i) l'utilisation d'un peracide et (ii) l'utilisation d'un époxyde comme substrat de départ. En effet, les peracides sont des oxydants connus pour leur faculté à réaliser des réactions d'époxydation d'alcènes.²¹⁷ Une des hypothèses formulée pour la formation du diol serait donc le passage par un intermédiaire époxyde qui serait ensuite ouvert en présence de l'oxydant (**Schéma III-25**).

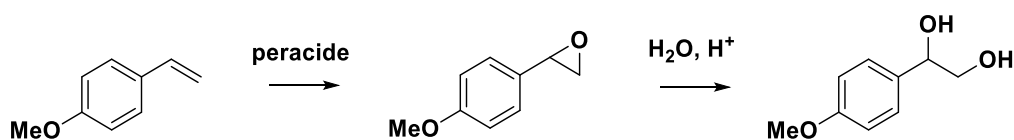


Schéma III-25 : Mécanisme proposé pour la formation du 1-(4-méthoxyphényl)éthane-1,2-diol.

Chapitre III : Développement d'une biocatalyse hétérogène

La catalyse d'oxydation du 4-méthoxystyrène a donc été testée en présence de *m*-CPBA en présence et en absence des CLEC NikA/Fe-L2. Comme pour l'Oxone®, le 1-(4-méthoxyphényl)éthane-1,2-diol est formé avec un rendement de 13%, même en absence de catalyseur. Ensuite, une catalyse d'oxydation du 2-(4-méthoxyphényl)oxirane, époxyde du 4-méthoxystyrène, a été réalisée en présence d'Oxone® ou de *m*-CPBA. Lors de cette catalyse, le diol est formé avec un rendement de 78%. Ce résultat semble indiquer que la formation du diol passerait par un intermédiaire époxyde.

Pour le β -méthoxystyrène, la formation des deux produits réactionnels avec l'Oxone® n'impliquerait pas le même mécanisme réactionnel. En effet, la formation de **7a** est catalysée alors que celle de **7m** ne nécessite pas l'emploi d'un catalyseur. Pour le produit **7m**, certaines études ont montré que l'intermédiaire époxyde, le 2-méthoxy-3-phényloxirane, n'était pas stable à cause de l'assistance du groupement électrodonneur méthoxyle.²¹⁸ Dans notre cas, cet intermédiaire pourrait évoluer afin de former le produit **7m** (Schéma III-26).

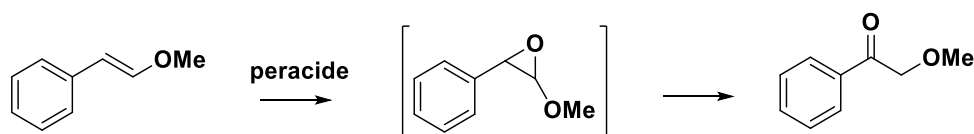


Schéma III-26 : Mécanisme proposé pour la formation de **7m**.

Concernant la formation de **7a**, le mécanisme réactionnel est basé sur le métal puisqu'en absence de catalyseur, le rendement décroît de 33% à 7%. Généralement, la coupure oxydante d'alcènes fait intervenir un mécanisme réactionnel impliquant 4 électrons. Deux hypothèses sont donc possibles pour la formation de ce produit : soit deux molécules d'Oxone® sont impliquées dans un même cycle catalytique, soit, une seule molécule d'Oxone® et une molécule d'O₂ sont impliquées.

Pour déterminer si O₂ intervient dans le mécanisme réactionnel, deux expériences de catalyse d'oxydation du β -méthoxystyrène ont été testées : (i) en présence d'un piègeur radicalaire et (ii) en absence d'O₂. En effet, pour qu'O₂ intervienne dans le mécanisme réactionnel, la réaction doit être radicalaire. En présence de DMPO, le rendement de **7a** est drastiquement diminué de 33% à 7% (Tableau III-13, entrées 1 et 2). Ces résultats correspondent au rendement obtenu en absence de catalyseur (Tableau III-12, entrée 5). Cette réaction étant radicalaire, O₂ pourrait intervenir en tant que deuxième oxydant. Une deuxième expérience

réalisée en absence d'O₂ permet de confirmer ces résultats avec l'obtention d'un rendement de seulement 9% (33% dans les conditions standard) (**Entrée 3**).

Tableau IV-13 : Différentes conditions de catalyse d'oxydation du β-méthoxystyrène par les CLEC NikA/Fe-L2.

Entrée	Oxydant	Conditions	5a (%)	6m (%)	Sélectivité ^[b]
1	KHSO ₅	-	33	21	61:39
2		+ DMPO ^[a]	7	25	22:78
3		Sans O ₂	9	23	28:72

^[a] 750 équivalents. ^[b] aldéhyde:cétone.

Ces résultats permettent de proposer un mécanisme réactionnel (**Schéma III-27**). Dans un premier temps, l'Oxone® serait activé par les CLEC NikA/Fe-L2. Ensuite, l'espèce Fe(III)-O• radicalaire serait formée par coupure homolytique de la liaison O-O. L'hypothèse d'une coupure hétérolytique conduisant à la formation d'une espèce Fe(V)=O serait réfutée puisqu'elle ne permettrait pas la formation d'un radical. L'espèce Fe(III)-O• formée serait ensuite additionnée sur le carbone de la double liaison en position α du phényle pour produire un radical sur la position β qui pourrait ensuite réagir avec une molécule d'O₂ conduisant à la coupure oxydante.

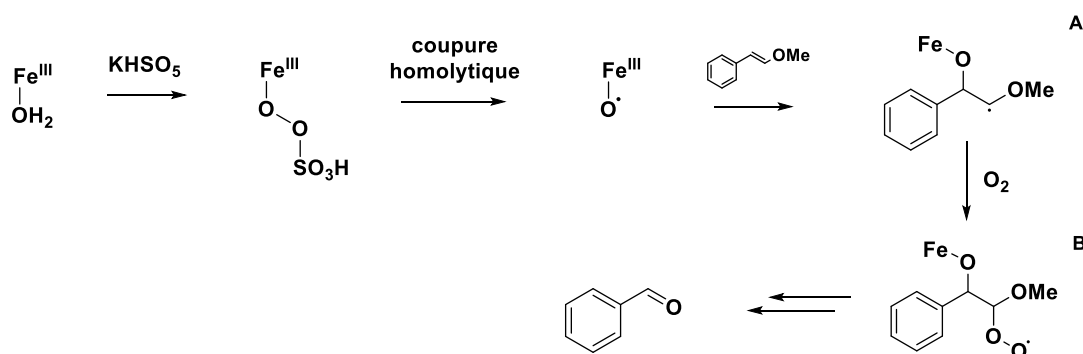


Schéma III-27 : Mécanisme proposé pour la formation de 7a.

Par analogie, un mécanisme réactionnel peut aussi être proposé pour les catalyses d'oxydation réalisées avec le couple O₂/DTT (**Schéma III-28**). Le mécanisme réactionnel débiterait par la réduction lente du Fe(III) en Fe(II) par un électron provenant du DTT. Ensuite, l'espèce Fe(II) formée activerait O₂ pour former l'espèce Fe(III)-superoxo ce qui permettrait de justifier l'inhibition de l'activité catalytique en présence de DMPO. Ensuite, une compétition aurait lieu entre une molécule de DTT et l'alcène. Soit l'espèce Fe(III)-superoxo réagit avec un

électron et un proton du DTT pour former l'espèce Fe(III)-hydroperoxo, soit elle réagit directement avec l'alcène afin de former l'intermédiaire réactionnel **A**. Concernant la première voie, l'intermédiaire Fe(III)-hydroperoxo pourrait évoluer en intermédiaire Fe(V)=O suite à la coupure hétérolytique de la liaison O-O. Cette espèce est privilégiée par rapport à la formation d'une espèce Fe(IV)=O qui résulterait de la coupure homolytique de la liaison O-O. En effet, la formation d'un intermédiaire Fe(IV)=O entrainerait la formation de radicaux libres OH[•], espèces hautement réactives, qui pourraient réagir de façon non contrôlée avec plusieurs liaisons C-H du substrat (aromatique, alcène, etc...). L'espèce Fe(V)=O agirait de la même manière que l'Oxone® ou que le *m*-CPBA en transférant son atome d'oxygène sur la double liaison amenant à la formation de l'intermédiaire époxyde instable qui évoluerait vers la formation de l'espèce **7m**. Concernant la 2^{ème} voie, l'intermédiaire **A** formé réagirait avec une deuxième molécule d'O₂ permettant la formation de l'intermédiaire **B**. Le superoxo nouvellement formé pourrait entrainer la coupure de la liaison C-C située entre le carbone α et le carbone β et permettre la formation de l'aldéhyde ainsi que d'un intermédiaire Fe(IV)=O. Ce dernier pourrait ensuite être réduit par une nouvelle molécule de DTT pour clore le cycle catalytique.

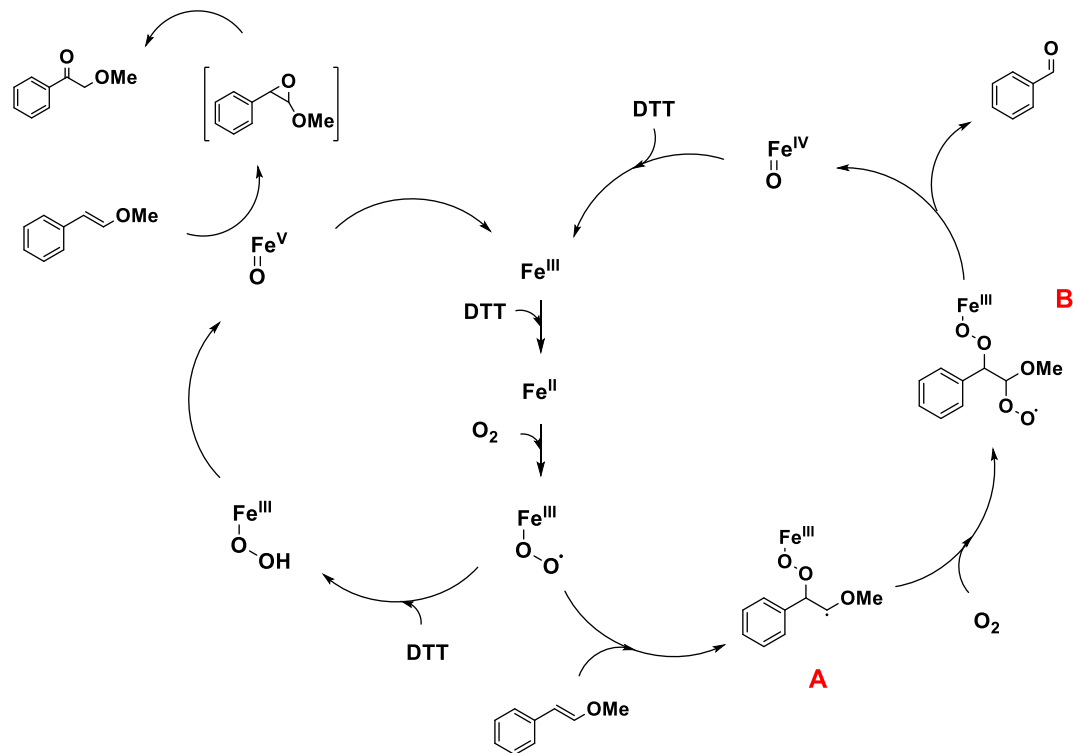


Schéma III-28 : Mécanismes proposés pour les catalyses d'oxydation réalisées avec le couple O₂/DTT.

6-4. Conclusion

Le challenge était de développer un système CLEC capable d'activer O₂ afin de transférer un ou deux atomes d'oxygène sur un substrat exogène. D'excellentes propriétés catalytiques ont été obtenues avec le système **CLEC NikA/Fe-L2** : des catalyses d'oxydation très efficaces d'un éther d'énol ou d'alcènes avec des rendements élevés (78% de rendement global pour les **CLEC NikA/Fe-L2** sur l'éther d'énol). De plus, les propriétés de stabilité et de recyclabilité des catalyseurs hétérogènes s'appliquent à notre système CLEC avec une stabilité exceptionnelle (plus de 28 000 TON réalisés sur 50 tours successifs) sans perte d'activité alors que les catalyseurs en solution ne dépassent pas les 500 TON. La réactivité est totalement dépendante du complexe inséré au sein des cristaux réticulés ce qui montre l'importance de l'optimisation des complexes pour l'amélioration des activités catalytiques et des stabilités. Le mécanisme réactionnel de ce système CLEC est probablement réalisé en deux étapes : une première étape qui implique l'activation d'une première molécule d'O₂ induisant une chimie radicalaire, comme observée dans les monooxygénases, suivie de l'intervention d'une seconde molécule d'O₂ conduisant à un mécanisme d'oxydation à 4 électrons peu courant chez les oxygénases naturelles.

7. Conclusion générale

Le but du projet était de développer une biocatalyse hétérogène à partir de métalloenzymes artificielles solubles conçues au laboratoire. Pour cela, la technologie CLEC a été mise en place sur la protéine NikA en présence de différents complexes de fer afin de cibler différentes réactions d'oxydation. Trois systèmes CLEC ont été développés : (i) le **CLEC NikA/Fe-LIII** pour réaliser une réaction de sulfoxydation sur divers substrats thioéthers avec du NaOCl, (ii) le **CLEC NikA/Fe-L2** capable de faire de l'hydroxychloration d'alcènes en présence d'Oxone® et de NaCl et (iii) le même système **CLEC NikA/Fe-L2** capable d'activer O₂ en présence de DTT pour réaliser de la coupure oxydante (dans la majorité des cas). La réticulation de cristaux de protéine a montré qu'elle permettait de conférer des activités catalytiques aux complexes ancrés au sein de ces cristaux (réactivités d'hydroxychloration ou de sulfoxydation) ou d'activer des complexes inorganiques ne possédant aucune réactivité intrinsèque (**Fe-EDTA**). Ces systèmes permettent de combiner les avantages des différents modes de catalyse.

Chapitre III : Développement d'une biocatalyse hétérogène

Une très grande efficacité catalytique, des cinétiques allant jusqu'à 500 min^{-1} et une très grande sélectivité avec des régio- et chimiosélectivités de 100% que l'on retrouve dans le domaine de la biocatalyse. Ils possèdent les avantages de la catalyse homogène puisqu'un même système **CLEC NikA/Fe-L2** est capable de réaliser différentes réactivités sur le même substrat en changeant uniquement le type d'oxydant. Pour finir, ils ont les avantages de la catalyse hétérogène puisqu'ils peuvent être réutilisés plus de 50 fois (dans le cas de la réactivité avec O_2) et être utilisés dans des conditions d'oxydation drastiques, à des pH acides, à hautes températures et en solvants organiques. De plus, la technologie CLEC en particulier présente des avantages qui lui sont propres comparée aux systèmes en solution. Par exemple, grâce à la très forte concentration locale en catalyseur, l'activité catalytique est largement améliorée par rapport aux systèmes en solution (4 à 5 fois). De plus, la cristallographie aux rayons X permet une caractérisation précise des catalyseurs. Par ailleurs, cette méthodologie permet de préserver l'intégrité et l'activité de l'enzyme. Finalement, les cristaux mésoporeux obtenus possèdent de nombreux canaux de solvant avec une haute teneur en solvant d'environ 50% permettant une diffusion aisée des substrats et des produits de la surface jusqu'au site actif. Avec cette technologie, de nouvelles perspectives pour l'utilisation du système CLEC facilement modulable sont possibles. En effet, une large variété de complexes peut être insérée au sein de la protéine NikA (ou autre) afin de développer de nouvelles réactivités permettant de diversifier ce système.

Références

207. S. Lopez, L. Rondot, C. Cavazza, M. Iannello, E. Boeri-Erba, N. Burzlaff, F. Strinitz, A. Jorge-Robin, C. Marchi-Delapierre and S. Ménage, *Chemical Communications*, 2017, DOI: 10.1039/C6CC08873B.
208. L. Rondot, Thesis Thesis of Université Grenoble Alpes, 2016.
209. M. V. Cherrier, E. Girgenti, P. Amara, M. Iannello, C. Marchi-Delapierre, J. C. Fontecilla-Camps, S. Ménage and C. Cavazza, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2012, **17**, 817-829.
210. F. Oddon, E. Girgenti, C. Lebrun, C. Marchi-Delapierre, J. Pécaut and S. Ménage, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, **2012**, 85-96.
211. E. Wilhelm, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1905, **38**, 880-882.
212. H. T. Clarke, H. B. Gillespie and S. Z. Weisshaus, *Journal of the American Chemical Society*, 1933, **55**, 4571-4587.
213. W. W. Fish, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, 1988, vol. 158, pp. 357-364.
214. J. S. Son, K. S. Jung, H. R. Kim and J. N. Kim, *Synthetic Communications*, 1998, **28**, 1847-1855.
215. H. Hussain, I. R. Green and I. Ahmed, *Chemical Reviews*, 2013, **113**, 3329-3371.
216. A. Christine, O. Masato, K. Fumihito, K. Akinori, I. Mitsunori, F. Sotaro, O. Masanori, S. Ichio, P. Sam-Yong, T. J. R. H. and H. J. G., *Acta Crystallographica Section D*, 2007, **63**, 221-229.
217. D. Swern, in *Organic Reactions*, 2011, DOI: doi:10.1002/0471264180.or007.07.
218. A. M. Al-Ajlouni and J. H. Espenson, *Journal of the American Chemical Society*, 1995, **117**, 9243-9250.
219. T. Tamai, K. Fujiwara, S. Higashimae, A. Nomoto and A. Ogawa, *Organic Letters*, 2016, **18**, 2114-2117.
220. T. Tamai and A. Ogawa, *The Journal of Organic Chemistry*, 2014, **79**, 5028-5035.
221. L. Dimitris and K. C. G., *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2017, **359**, 323-328.
222. B. C. Ranu and T. Mandal, *Synlett*, 2007, **2007**, 0925-0928.
223. C. Bolm and F. Bienewald, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1996, **34**, 2640-2642.
224. M. Alfonso-Prieto, X. Biarnés, P. Vidossich and C. Rovira, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, **131**, 11751-11761.

Chapitre IV

Chapitre IV : Vers une chimie tandem

1. Introduction

La Nature a développé de nombreuses voies métaboliques basées sur des réactions en cascade très efficaces et très sélectives permettant de synthétiser des molécules très complexes possédant plusieurs nouvelles fonctionnalités.¹⁷⁵ Dans le cadre d'une chimie durable, de nombreux chercheurs veulent s'inspirer de ces processus en combinant les différents modes de catalyse (biocatalyse, catalyse homogène ou hétérogène) afin de limiter la production de déchets chimiques en évitant les étapes de purification intermédiaires (économie d'atomes), de réduire les temps et les coûts de production ou encore d'améliorer l'efficacité de la réaction. Différentes combinaisons de catalyseurs sont possibles : (i) la combinaison de plusieurs catalyseurs chimiques,¹⁶¹ (ii) la combinaison de plusieurs biocatalyseurs¹⁷² ou encore (iii) la combinaison de catalyseurs chimiques et de biocatalyseurs.¹⁷⁷ Cette dernière combinaison propose d'allier les avantages de la biocatalyse et de la catalyse chimique (homogène et/ou hétérogène) permettant d'élargir le champ des possibilités en proposant de nouvelles voies métaboliques bio-inspirées capables de combiner des réactions naturelles et non-naturelles. Cependant, les chercheurs doivent faire face aux nombreuses limitations qui existent pour ce type d'approche. En effet, l'incompatibilité des conditions réactionnelles (pH, solvant, température, etc...) ou encore les différents problèmes d'inhibition qui existent entre les différents types de catalyseurs freine le développement de ce type d'approche, notamment pour des réactions d'oxydation. Dans le domaine de la chimie tandem, mon projet de thèse propose une approche originale, basée sur l'exploration de nouvelles méthodologies à partir des systèmes CLEC mis au point dans le chapitre précédent. L'utilisation de ces biocatalyseurs hétérogènes a pour objectif de compartimenter les différents complexes inorganiques ce qui est essentiel afin d'éviter les interférences entre eux. De plus, les différentes réactivités ont été développées dans des conditions réactionnelles similaires (même solvant, même température) facilitant la mise au point de ce projet. Trois réactivités d'oxydation catalysées par des CLEC ont été développées au cours de ma thèse : (i) la coupure oxydante de dérivés du styrène avec le couple O₂/DTT en présence des **CLEC NikA/Fe-L2**, (ii) l'hydroxychloration d'alcènes avec le couple Oxone®/NaCl toujours en présence des **CLEC NikA/Fe-L2** et (iii) la sulfoxydation de thioéther avec NaOCl en

présence des CLEC **NikA/Fe-LIII**. Sur la base de ces résultats, il semblait judicieux d'associer deux de ces réactions catalytiques pour des substrats contenant les deux motifs clés (styrène et thioanisole).

Dans ce chapitre, deux réactions de chimie tandem indépendantes seront testées : (i) la coupure oxydante d'alcènes soufrés suivie de la sulfoxydation du thioéther pour la production des composés bifonctionnels de type sulfoxyde-aldéhyde (deux réactions) et (ii) une réaction d'hydrothiolation suivi de la sulfoxydation du thioéther pour donner des composés monofonctionnels de type sulfoxyde (deux réactions) (**Schéma IV-1**).

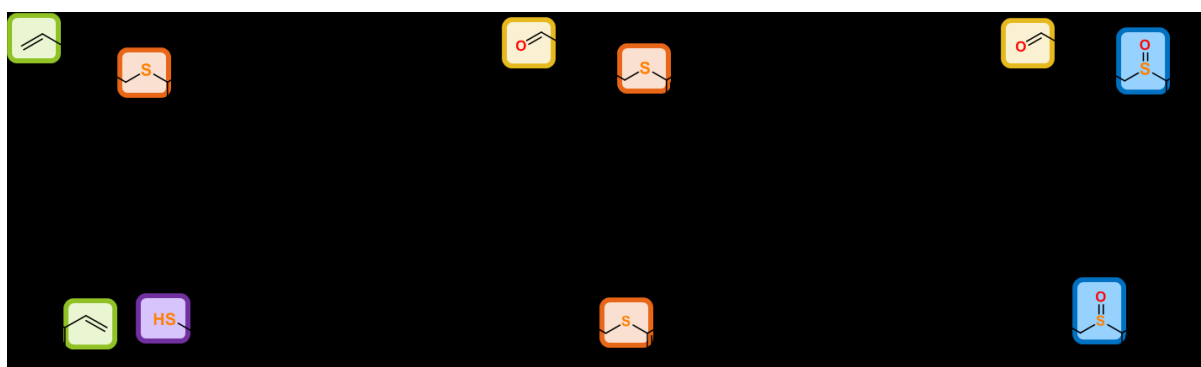


Schéma IV-1 : Représentation schématique des réactions tandem qui seront développées.

2. Développement de la réaction tandem coupure oxydante/sulfoxydation.

Afin de développer une chimie tandem efficace, les réactions mises en jeu doivent être orthogonales. Le premier objectif a donc été de déterminer la compatibilité des différentes réactions entre elles. L'association des réactions de coupure oxydante et de sulfoxydation est alors privilégiée. En effet, l'activation d' O_2 par les CLEC est chimiospécifique vis-à-vis de l'alcène alors que la catalyse avec NaOCl est chimiospécifique du thioéther. En revanche, la réactivité d'hydroxychloration réalisée par les CLEC est à éviter puisque l'Oxone® est capable de réagir avec les deux fonctions chimiques. Bien que la catalyse avec NaOCl soit chimiospécifique, une dégradation rapide des CLEC avait été observée avec cet oxydant. La solution envisagée est d'utiliser un oxydant plus doux, comme par exemple H_2O_2 , permettant ainsi le recyclage des CLEC sur plusieurs tours de catalyse.

2-1. Développement d'une réactivité de sulfoxydation en présence d'H₂O₂ et des CLEC

L'utilisation d'un lot unique de CLEC pourrait simplifier la mise au point de la réaction tandem. Dans ce cadre, les différentes expériences menées pour développer une réactivité de sulfoxydation avec H₂O₂ ont été effectuées avec les **CLEC NikA/Fe-L2**. De nombreuses conditions réactionnelles ont été testées afin d'obtenir les conditions optimales (ratio, solvant, temps, température) pour la sulfoxydation du 2-méthylthionaphtalène, substrat plus réactif que le thioanisole classiquement employé. L'exemple le plus représentatif est présenté dans le **Tableau IV-1**.

Tableau IV-1 : Conditions optimales pour la réactivité de sulfoxydation du 2-méthylthionaphtalène.

<i>Entrée</i>	Catalyseur	Rendement (%)^[a]	Sélectivité^[b]
1	CLEC NikA/Fe-L2	82	100:0
2	Fe-L2	4	100:0
3	-	4	100:0
4	Polymère de glutaraldéhyde seul	83	100:0

^[a] Conditions réactionnelles : catalyseur/substrat/H₂O₂ 1/1000/1500, 6h, CH₃CN/H₂O 1/1.

^[b] sulfoxyde:sulfone.

Un seul produit réactionnel est obtenu, le 1-(méthylsulfinyl)naphtalène, avec un très bon rendement de 82% alors qu'avec le complexe seul ou en absence de catalyseur, presque aucune réactivité n'est observée (**Entrées 2 et 3**). En revanche, pour s'assurer que la réactivité provient bien du catalyseur au sein des cristaux, la catalyse a aussi été réalisée en présence du polymère de glutaraldéhyde qui se forme au cours de l'étape de réticulation des cristaux. En effet, lors de cette étape, l'ajout de glutaraldéhyde provoque la formation d'un polymère même en absence de cristaux. Le polymère formé en absence de cristaux a été testé dans les mêmes conditions réactionnelles que précédemment (polymère provenant de quatre gouttes de tampon A, même quantité qu'en présence de 100 cristaux). De façon surprenante, 83% de rendement en sulfoxyde a été atteint avec une chimiosélectivité de 100%. Le polymère de glutaraldéhyde possède donc la même réactivité que les CLEC. Cette observation permet donc d'affirmer que la réactivité de sulfoxydation provient donc du polymère seul. Faute de temps,

la nature des interactions entre le polymère et les cristaux n'a pas été déterminée. Ces résultats indiquent que l'oxydant H_2O_2 réagirait avec les espèces formées par la réaction entre le glutaraldéhyde et le tampon afin de créer une espèce oxydante active capable de réaliser la sulfoxydation chimiosélective de thioéthers.

Suite à ces résultats, une étude de stabilité du polymère a alors été réalisée sur l'oxydation du 2-méthylthionaphtalène dans les conditions réactionnelles standard (**Figure IV-1**).

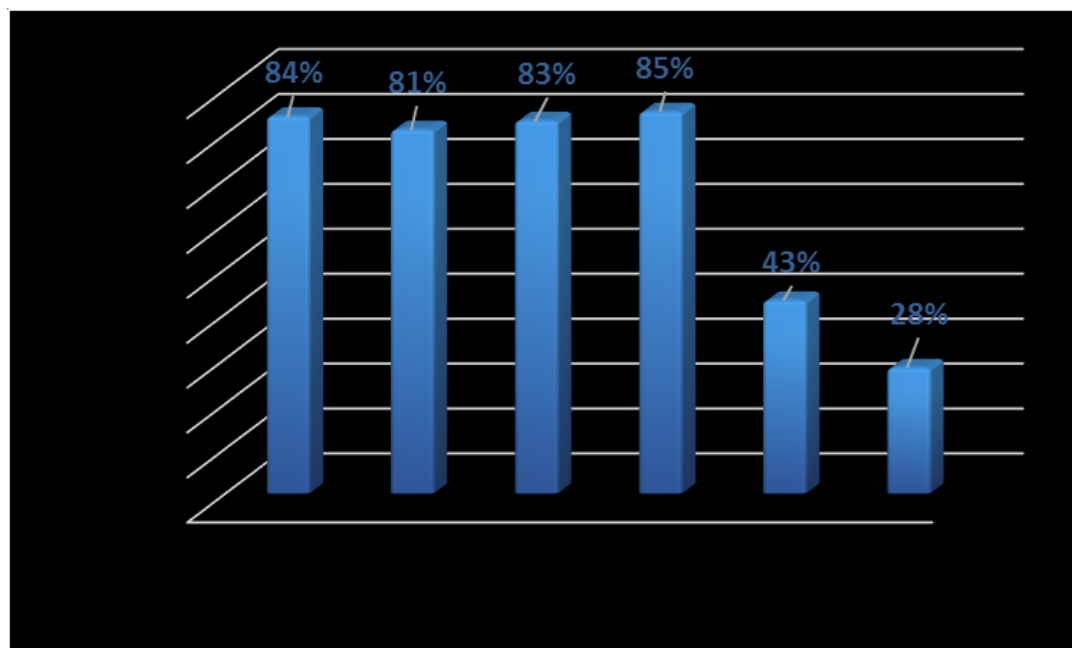


Figure IV-1 : Stabilité du polymère au cours de la réaction de sulfoxydation avec H_2O_2 .

Avec H_2O_2 , le polymère garde son activité catalytique complète sur 4 tours de catalyse successifs avant une diminution drastique de cette activité à partir du 5^{ème} tour de catalyse pour un total de 4040 TON réalisés en 6 tours de catalyse. Même si ce résultat était inattendu, il a tout de même été envisagé de développer une chimie tandem combinant la réactivité du polymère (sulfoxydation) avec la réactivité des CLEC (coupure oxydante).

2-2. Mise au point de la réaction tandem

Les deux acteurs de la catalyse sont issus de l'étape de réticulation—Pour la catalyse envisagée, 100 CLEC sont utilisés. Il a été nécessaire de synthétiser un substrat adéquat pour la réaction tandem. Le choix s'est porté sur la synthèse du phényl(4-vinylbenzyl)thioéther (**8a**), possédant le motif thioanisole couplé au motif styrène en condensant le 1-

(chlorométhyl)-4-vinylbenzène avec le thiophénol selon le schéma réactionnel présenté ci-dessous (**Schéma IV-2**) :

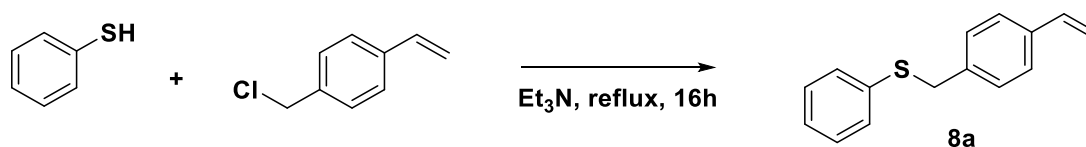


Schéma IV-2 : Synthèse du phényl(4-vinylbenzyl)thioéther (**8a**)

La réaction tandem peut être effectuée de deux façons différentes : (i) coupure oxydante puis sulfoxydation ou (ii) sulfoxydation puis coupure oxydante. En premier lieu, les deux réactivités de coupure oxydante et de sulfoxydation ont été testées indépendamment. La réactivité de coupure oxydante a été réalisée en présence des **CLEC NikA/Fe-L2** et des **CLEC NikA/Fe-LIII** sur le substrat original **8a** et son équivalent déjà oxydé, le sulfoxyde **12a**. Le ratio catalyseur/substrat/DTT est de 1/1000/1500 et la réaction est agitée pendant 2 h à température ambiante (**Schéma IV-3**).

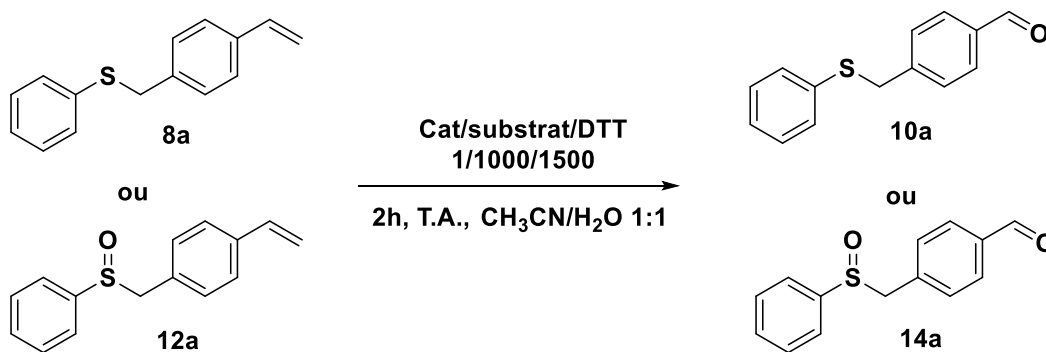


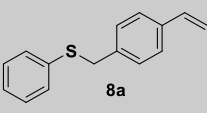
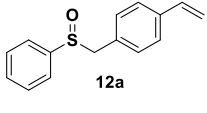
Schéma IV-3 : Réactivité coupure oxydante des substrats **8a** et **12a**.

En présence des **CLEC NikA/Fe-L2**, la réactivité de coupure oxydante de ce type de substrats (**8a** ou **12a**) est possible alors que le styrène, substrat de référence, reste intact. La présence d'un groupement benzylthioéther en position *para* de la double liaison permet donc d'activer la double liaison qui peut alors réagir avec l'espèce oxydante.

Préalablement, nous avons observé que le polymère avait la même réactivité que les CLEC en sulfoxydation. Concernant le substrat **8a** en présence des **CLEC NikA/Fe-L2**, seulement 23% de rendement sont obtenus (**Tableau IV-2, entrée 1**), résultat similaire avec le complexe seul (17%, **entrée 2**). Les rendements sont supérieurs avec les catalyseurs à base de **Fe-LIII** avec

des rendements de 27% pour les CLEC et 39% pour le complexe seul (**Entrées 3 et 4**). En revanche, bien que l'aldéhyde soit formé, le rendement ne correspond pas à la conversion du substrat. Or, aucun autre produit réactionnel n'est détecté en GC/MS ou en HPLC. Concernant le substrat **12a**, la même tendance est observée : des rendements plus élevés pour les catalyseurs à base de **Fe-LIII** (32% pour les CLEC et 37% pour le complexe seul, **entrées 8 et 9**).

Tableau IV-2 : Réactivité de coupure oxydante de **8a** et **12a**.

Entrée	Catalyseur	Substrat de départ	Rendement aldéhyde (%)	Conversion (%)
1	CLEC NikA/Fe-L2 ^[a]	 8a	23	57
2	Fe-L2		17	44
3	CLEC NikA/Fe-LIII ^[a]		27	70
4	Fe-LIII		39	83
5	-		0	0
6	CLEC NikA/Fe-L2 ^[a]	 12a	7	16
7	Fe-L2		5	7
8	CLEC NikA/Fe-LIII ^[a]		32	81
9	Fe-LIII		37	93
10	-		0	0

Catalyseur/substrat/DTT 1/1000/1500, 2h. ^[a]en présence du polymère.

Des recherches plus poussées ont été effectuées pour déterminer le(s) autre(s) produit(s) réactionnel(s) formé(s) non visible(s) dans les méthodes utilisées en GC et en HPLC. Pour cela, la réaction standard a été réalisée sur le substrat **8a** en présence du complexe **Fe-LIII** à l'échelle du milligramme afin de pouvoir caractériser le(s) espèce(s) formée(s) en RMN et en masse. Plusieurs nouvelles espèces ont été observées (**Schéma IV-4**).

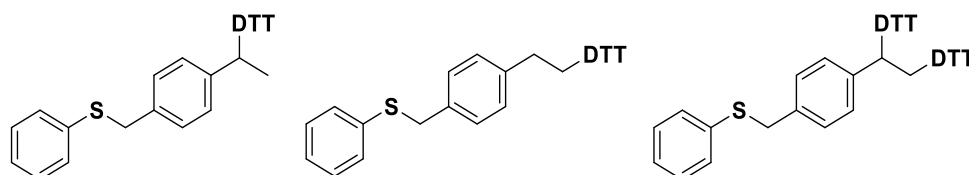


Schéma IV-4 : Autres espèces formées lors de la catalyse d'oxydation de **8a** avec le couple O_2 /DTT.

Une ou deux réactions d'hydrothiolation entre le DTT et l'alcène sont possibles dans les conditions réactionnelles standard. En effet, de nombreux exemples de réactions d'hydrothiolation entre des groupements thiols et des doubles liaisons sont décrits dans la littérature.²¹⁹⁻²²¹ De nouvelles conditions réactionnelles doivent donc être testées afin d'améliorer la sélectivité en faveur de la formation de l'aldéhyde.

La réactivité de sulfoxydation par H₂O₂ été réalisée en présence de **CLEC NikA/Fe-L2**, du substrat original **8a** et de son produit de coupure oxydante, l'aldéhyde **10a**. Le substrat a été mis en présence de 1,5 équivalents d'H₂O₂ la réaction est agitée pendant 16 h à température ambiante (**Schéma IV-5**).

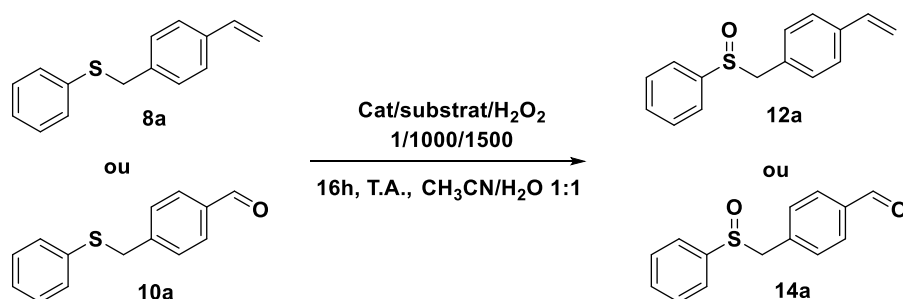


Schéma IV-5 : Réactivité de sulfoxydation des substrats **8a** et **10a**.

En ce qui concerne le substrat **8a**, aucune activité catalytique n'est observée, peu importe le catalyseur testé (**Tableau IV-3**, entrées 1-3).

Tableau IV-3 : Réactivité de sulfoxydation avec H₂O₂ de **8a** et **10a**.

Entrée	Catalyseur	Substrat de départ	Rendement sulfoxyde (%) ^[a]	Sélectivité ^[b]
1	CLEC NikA/Fe-L2 ^[b]		5	100:0
2	Fe-L2		3	100:0
3	Fe-LIII		3	100:0
4	-		0	-
5	CLEC NikA/Fe-L2 ^[b]		35	100:0
6	Fe-L2		5	100:0
7	Fe-LIII		6	100:0
8	-		0	-

1,5 éq. d'H₂O₂, 16h. ^[a] sulfoxyde:sulfone. ^[b] en présence du polymère.

En revanche, lorsque le substrat utilisé est **10a**, le polymère de glutaraldéhyde catalyse la réaction avec un rendement de 35% et une chimiosélectivité de 100% en faveur du sulfoxyde alors que les complexes seuls n'ont pratiquement aucune réactivité (**Entrées 5-7**). Ces résultats montrent que la présence de l'aldéhyde sur le substrat de départ a un impact non négligeable sur la réactivité de sulfoxydation. Ce résultat reste encore à expliquer.

D'après les résultats obtenus pour les réactions indépendantes, pour que la réaction tandem soit fonctionnelle, elle doit débiter par la coupure oxydante de l'alcène suivie de la sulfoxydation du thioéther. La réaction tandem est donc réalisée dans les conditions présentées **Schéma IV-6**.

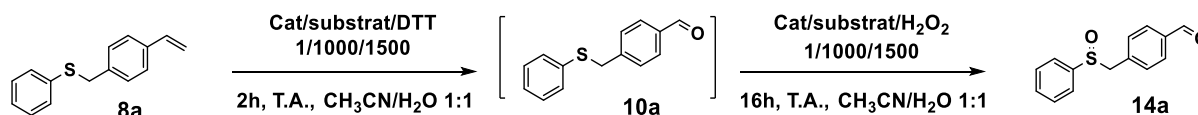


Schéma IV-6 : Conditions réactionnelles pour la réaction tandem.

Pour la réaction tandem, les **CLEC NikA/Fe-L2** ont été choisis car leur préparation est moins contraignante que celle des **CLEC NikA/Fe-LIII** qui doit se faire en boîte à gants. Le système CLEC possède la particularité d'avoir finalement deux centres catalytiques différents : (i) le site actif de l'enzyme pour la réactivité de coupure oxydante réalisée par le complexe **Fe-L2** et(ii) les imines du polymère de glutaraldéhyde/Tris-HCl qui formeraient une nouvelle espèce oxydante en présence d'H₂O₂. Pour cette expérience, les **CLEC NikA/Fe-L2** sont mis en présence de **8a** et de DTT puis, après 2 h de réaction, H₂O₂ est additionné directement dans le même milieu réactionnel (**Tableau IV-4**).

Tableau IV-4 : Réaction tandem sur **8a**.

Entrée	Catalyseur	Rendement 10a (%)	Rendement 12a (%)	Rendement 14a (%)	Taux de conversion (%)
1	CLEC NikA/Fe-L2 ^[a]	14	0	9	74
2	Fe-L2	8	0	3	25
3	-	<1	0	0	7

^[a] en présence du polymère.

Premièrement, en présence des **CLEC NikA/Fe-L2**, deux produits réactionnels sont obtenus : le produit final souhaité (**14a**) avec un rendement faible de 9% et le produit intermédiaire résultant de la coupure oxydante (**10a**) avec un rendement de 14%. De plus, nous pouvons

constater que dans ces conditions réactionnelles, on retrouve les résultats obtenus pour les réactions isolées. La coupure oxydante s'est bien faite avec un rendement de 23% (**10a** + **14a**) dont 36% ont été transformés en produit final **14a** (**Entrée 1**). En présence du complexe **Fe-L2**, la réactivité est moins intéressante puisque seulement 25% du substrat a été consommé ne conduisant qu'à 3% de produit final (**Entrée 2**). En absence de catalyseur, aucune réactivité n'est observée (**Entrée 3**). Ces premiers résultats montrent que la réaction tandem est réalisable. Toutefois, les rendements en produit final **14a** sont très faibles alors que le substrat est converti à 74%. Deux problèmes se posent donc pour cette réaction : (i) l'étape de sulfoxydation n'est pas complète (36% de rendement) et (ii) la première étape de la réaction n'est pas 100% chimiosélective. La première étape de la réaction est une compétition entre le l'hydrothiolation du DTT sur l'alcène et la coupure oxydante de l'aldéhyde. Cette réaction génère de nombreux produits résultant de la réaction d'hydrothiolation différents (avec l'oxydation des thioéthers formés). D'autres réducteurs doivent alors être testés afin de favoriser la formation de l'aldéhyde plutôt que la réaction de couplage.

- **Recherche d'autres réducteurs**

Afin d'avoir un criblage simple et efficace, les expériences de catalyse ont été réalisées sur le complexe inorganique seul plutôt que sur les CLEC. Le complexe **Fe-LIII** étant plus efficace que le complexe **Fe-L2**, celui-ci a été choisi. Les réactions de catalyse ont été réalisées avec un ratio catalyseur/substrat/thiol de 1/1000/3000 (**Figure IV-2**).

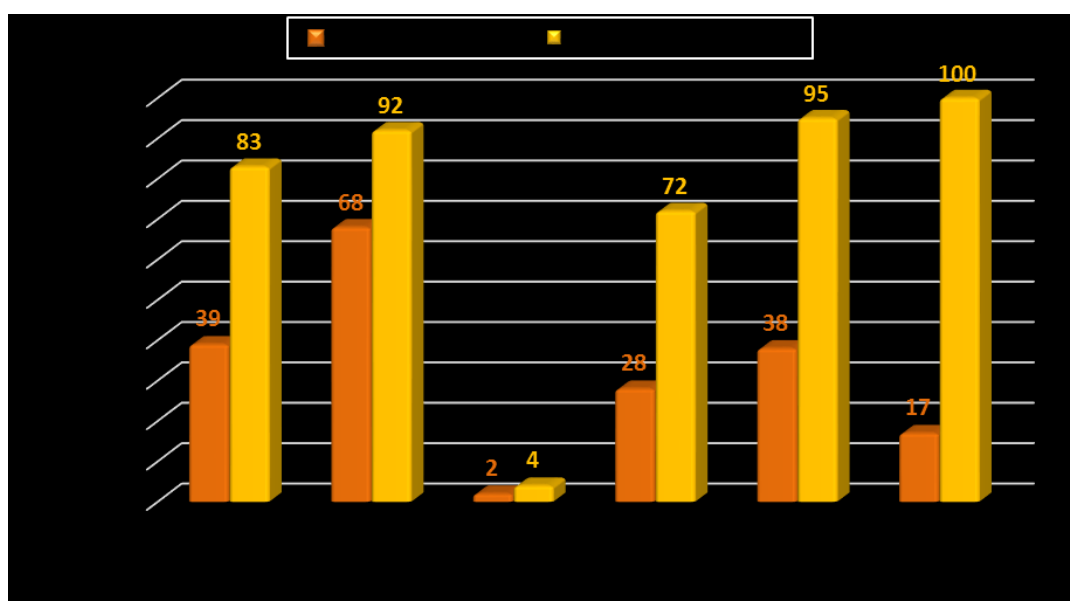


Figure IV-2 : Réactivité de coupure oxydante par **Fe-LIII** avec différents réducteurs.

Pour la majorité des réducteurs, les taux de conversion sont très élevés (72-100%) hormis pour la thiourée qui n'a pratiquement aucune réactivité. En comparant ces résultats à ceux du DTT, seul le β -mercaptoéthanol permet d'obtenir une meilleure sélectivité en faveur de **10a** (74%) avec un bon rendement (68%). Même si ce changement de réducteur permet d'améliorer les conditions standard, les rendements et sélectivités obtenues ne sont toujours pas suffisants pour développer une chimie tandem efficace et sélective.

Avec le thiophénol et le 4-méthylthiophénol, le taux de conversion est quasi-quantitatif alors que les rendements en aldéhyde **12a** sont seulement de 38 et 17%, respectivement. Toutefois, un seul produit secondaire a été identifié, le produit de monocouplage entre l'atome de soufre du thiophénol et le carbone en position β de la double liaison de l'alcène (**Schéma IV-7**). En absence de catalyseur, ni l'aldéhyde ni le produit résultant de la réaction d'hydrothiolation ne sont formés.

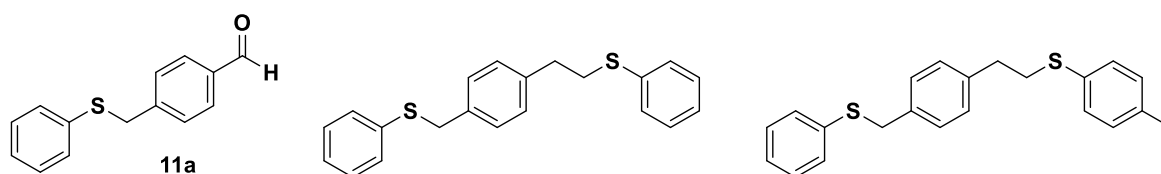


Schéma IV-7 : Produits formés lors de la catalyse en présence de thiophénol ou de toluéthiol.

Ces résultats montrent qu'en utilisant un réducteur de type thiophénol, seulement deux produits réactionnels sont formés : l'aldéhyde **10a**, résultant de la coupure oxydante, et un nouveau thioéther issu de la réaction d'hydrothiolation. De plus, la formation de ce thioéther peut être favorisée en fonction des conditions réactionnelles (choix du réducteur, choix du substrat de départ, choix des ratios, etc...). Pour la suite du projet, les résultats concernant la formation de l'aldéhyde **10a** n'étant pas assez pertinents, nous avons décidé de réorienter le projet de chimie tandem en optimisant la réaction d'hydrothiolation (efficacité et sélectivité) et en réalisant une deuxième étape de sulfoxydation du thioéther nouvellement formé.

2-3. Conclusion

Pour cette première réaction tandem, des résultats intéressants ont été obtenus : (i) la réaction tandem est possible, la combinaison de deux réactions d'oxydation a pu être réalisée en

présence des CLEC **NiA/Fe-L2** (et du polymère de glutaraldéhyde). En revanche, les rendements et les sélectivités ne sont pas à la hauteur de ce que nous attendions. La formation du produit **14a** est assez faible (9%). Ce manque de réactivité et de sélectivité provient de la formation d'autres produits réactionnels comme par exemple des produits résultant de la réaction d'hydrothiolation entre l'alcène et le DTT. Ces réactions parasites étaient inattendues au regard des résultats obtenus sur les CLEC au chapitre précédent ce qui démontre la difficulté de mettre en place une chimie cascade efficace et sélective. De plus, le catalyseur réalisant la réaction de sulfoxydation est un polymère porté par les CLEC dont la nature exacte n'a pas encore été identifiée. Pour s'affranchir de ces problèmes, le prochain objectif est de concevoir une réaction tandem avec une première étape d'hydrothiolation entre un alcène et un groupement thiol suivie d'une deuxième étape de sulfoxydation du thioéther formé avec un nouveau catalyseur.

3. Développement de la deuxième réaction tandem

3-1. Optimisation de la réaction de couplage

Par commodité, les réactions d'optimisation sont réalisées sur les complexes seuls plutôt qu'avec les CLEC (synthèse chronophage). Pour développer cette réactivité, le choix s'est porté sur le couplage de deux substrats de référence en présence de **Fe-LIII** : le styrène et le thiophénol. Pour cela, le ratio catalyseur/styrène/thiophénol est de 1/1000/1500 et le mélange réactionnel est agité pendant 1h (**Schéma IV-8**).

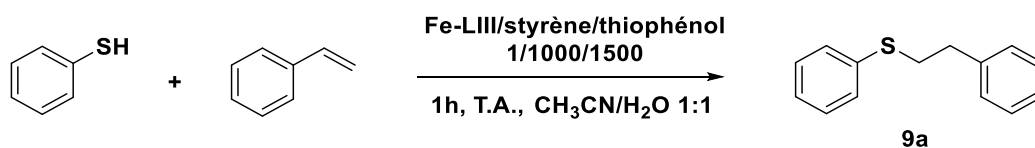


Schéma IV-8 : Réactivité d'hydrothiolation entre le styrène et le thiophénol en présence de **Fe-LIII**.

En présence de complexe, la réaction d'hydrothiolation est favorisée avec un rendement de 77% (770 TON) en **9a** et une chimiosélectivité de 91% (**Figure IV-3**). Le surplus de thiophénol entraîne la formation du composé disulfure avec un rendement de 25%. En absence de complexe, deux produits réactionnels sont formés : le composé disulfure avec un

rendement de 16% et l'alcool **11a** avec un rendement de 6%. Pour déterminer la provenance de l'alcool formé, une expérience de catalyse a été réalisée en absence d'oxygène en boîte à gants. Cette expérience a mis en évidence que le produit **11a** ne se formait pas ce qui permet d'affirmer que l'alcool est formé à partir d'une molécule d'O₂ (réaction radicalaire). Ces résultats montrent que le complexe **Fe-LIII** est nécessaire pour réaliser la réaction d'hydrothiolation pour former le thioéther **9a**. De plus, d'excellents rendements et chimiosélectivités sont obtenus pour cette réactivité. Cette première réaction est donc utilisable pour mettre au point une réaction tandem.

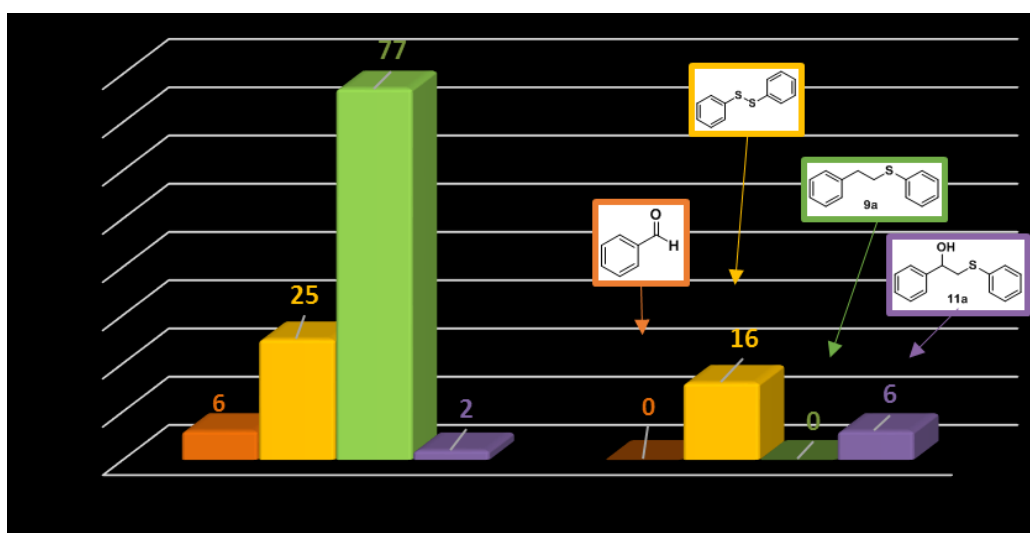
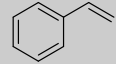
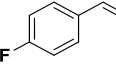
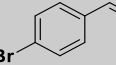
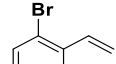


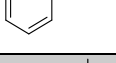


Figure IV-3 : Produits réactionnels formés lors de la réaction d'hydrothiolation entre le styrène et le thiophénol. Les rendements en disulfure sont calculés par rapport aux 1500 équivalents de thiophénol de départ.

Ensuite, l'expansion de la gamme de substrats a été étudiée afin de choisir le substrat qui permettrait d'obtenir les meilleurs rendements et sélectivités pour la réaction tandem (**Tableau IV-5**). En fonction du substrat, les rendements varient de 0 à 92% et la chimiosélectivité en faveur des produits d'hydrothiolation de 0 à 94% (**9a-9g**). Les substrats les plus réactifs possèdent des groupements électroattracteurs sur le cycle aromatique (**Entrées 2-4**). Par exemple, lors de l'hydrothiolation du 2-bromostyrène avec le thiophénol, 92% de rendement est obtenu pour le produit **9d** avec une excellente chimiosélectivité alors que pour le 4-méthoxystyrène, le rendement est légèrement moins bon (82%) mais avec une excellente chimiosélectivité (**Entrée 5**). Les rendements et les sélectivités sont drastiquement diminués lorsque la double liaison de l'alcène est substituée (**Entrées 6 et 7**). En effet, pour le *trans*- β -méthylstyrène, seulement 19% de produit résultant de la réaction d'hydrothiolation

est formé avec une chimiosélectivité moyenne. De plus, le disulfure est produit en plus grande quantité que pour les autres substrats (32%) ce qui démontre que la double liaison est moins réactive que celles des autres substrats. Deux paramètres semblent influencer sur la réactivité : (i) l'encombrement stérique et (ii) les effets électroniques dus aux groupements présents sur le motif styrène. L'encombrement stérique est le facteur le plus déterminant. En effet, lorsque les groupements sont situés sur le cycle aromatique, d'excellentes activités catalytiques et sélectivités sont observées. En revanche, la présence d'un de ces groupements sur la double liaison de l'alcène entraîne une chute drastique des rendements. En présence de groupements électroattracteurs, la réaction est très efficace permettant d'atteindre des rendements et des chimiosélectivités supérieurs à 90%.

Tableau IV-5 : Expansion de la gamme de substrats sur la réactivité d'hydrothiolation en présence du complexe **Fe-LIII**.

Entrée	Substrat	Aldéhyde Rdt (%)	Produit 9	Rdt (%)	Disulfure Rdt (%)	Taux de conversion (%)	Sélectivité ^[a] (%)
1		6	9a	77	25	85	91
2		7	9b	91	20	100	92
3		6	9c	89	23	97	91
4		6	9d	92	23	99	92
5		5	9e	82	11	90	94
6		5	9f	19	32	88	43
7		31	9g	0	14	87	0

Catalyseur/alcène/thiophénol 1/1000/1500, 1h, t.a. dans CH₃CN/H₂O 1/1 [^{a]} Chimiosélectivité en faveur du produit de l'hydrothiolation.

Ensuite, trois complexes de fer ont été testés en catalyse sur la réaction d'hydrothiolation du thiophénol sur le 2-bromostyrène dans les conditions standard : le complexe **Fe-LIII**, qui est le complexe de référence, le complexe **Fe-L2**, qui est un des complexes les plus actifs dans

les catalyses déjà développées, et du chlorure de fer, **FeCl₃**, pour mettre en évidence le rôle du ligand dans la réactivité (**Tableau IV-6**).

Tableau IV-6 : Comparaison de différents catalyseurs sur la réaction d'hydrothiolation du thiophénol sur le 2-bromostyrène dans les conditions standard.

Entrée	Catalyseur	Aldéhyde Rdt (%)	Produit 10d Rdt (%)	Disulfure Rdt (%)	Taux de conversion (%)	Sélectivité ^[a] (%)
1	Fe-LIII	6	89	23	97	91
2	Fe-L2	12	3	19	92	3
3	FeCl₃	6	4	15	98	4

^[a] Chimiosélectivité en faveur du produit résultant de la réaction d'hydrothiolation **9d**.

Seul le complexe **Fe-LIII** est capable de réaliser la réaction d'hydrothiolation (**Entrée 1**). En effet, les complexes **Fe-L2** et **FeCl₃** ne forment que 3% et 4% de **9d**, respectivement (**Entrées 2** et **3**). L'électronique du ligand a donc une influence importante pour cette réactivité et démontre que la réaction est bien catalysée par le fer. L'influence du ligand est à deux niveaux : soit il module l'acidité de Lewis du fer, soit il a un effet sur le pouvoir rédox du fer. Dans le cas de l'acidité de Lewis, le thiophénol pourrait être directement activé par le fer ou par une molécule d'eau liée au fer.²²² Afin d'identifier si H₂O a une influence sur la réaction, différents solvants ont été testés dans les conditions standard de catalyse (**Tableau IV-7**).

Tableau IV-7 : Réactivité d'hydrothiolation du thiophénol sur le 2-bromostyrène dans différents solvants.

Entrée	Catalyseur	Solvant	Produit 11d Rdt (%)	Produit 9d Rdt (%)	Disulfure Rdt (%)
1	Fe-LIII	CH ₃ CN	19	2	27
2	-		14	3	13
3	Fe-LIII	DCM	20	2	32
4	-		11	2	10
5	Fe-LIII	MeOH	5	9	35
6	-		13	2	13
7	Fe-LIII	H ₂ O	4	84	8
8	-		3	86	8

Lorsque la réaction est réalisée dans CH₃CN pur, DCM, ou MeOH, moins de 10% de rendement sont observés pour le produit d'hydrothiolation **9d** (contre 92% dans le mélange CH₃CN/H₂O 1/1). En revanche, quand le solvant utilisé est H₂O pure, en présence ou en absence de catalyseur, 84 et 86% de produit d'hydrothiolation **9d** sont formés, respectivement.

Par comparaison avec nos conditions réactionnelles (CH₃CN/H₂O 1/1 et **Fe-LIII** comme catalyseur), les rendements obtenus dans H₂O pure sont similaires (92% vs 86% après 1 h de réaction). Afin de discriminer la réactivité dans nos conditions réactionnelles et dans H₂O pure, les cinétiques de la réaction d'hydrothiolation ont été comparées (**Figure IV-4**).

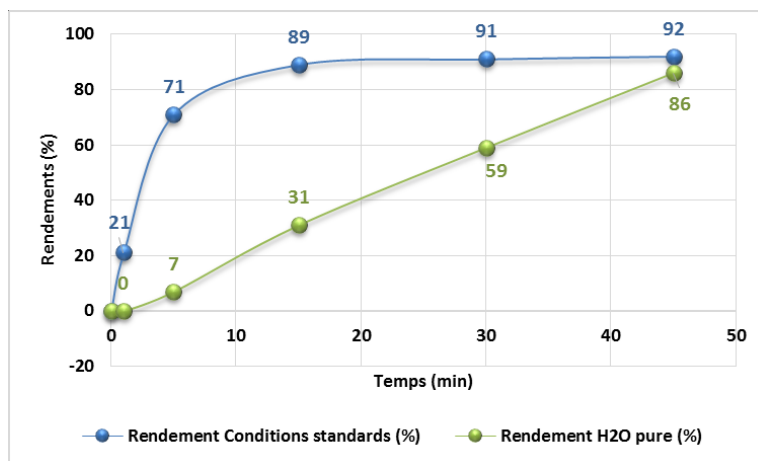


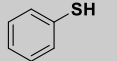
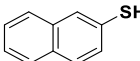
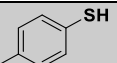
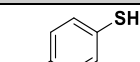
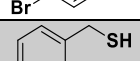
Figure IV-4 : Comparaison des cinétiques de production de **9d** dans les conditions standard (bleu) et dans H₂O pure sans catalyseur (vert).

Dans nos conditions standard, en présence de complexe **Fe-LIII** et d'un mélange CH₃CN/H₂O 1/1, la vitesse de production de **9d** est très rapide (210 min⁻¹). En revanche, dans H₂O pure en absence de catalyseur, la vitesse de réaction est ralentie d'un facteur 15. Bien que l'expérience puisse être réalisée dans H₂O pure sans catalyseur, l'utilisation d'un catalyseur dans les conditions réactionnelles standard permet l'augmentation d'un facteur 15 de la cinétique de formation de **9d**. D'après ces résultats, l'eau et le complexe sont nécessaires pour obtenir une catalyse efficace confirmant l'hypothèse d'un rôle d'acide de Lewis pour le catalyseur.

Pour compléter l'optimisation de cette réactivité, d'autres réactifs soufrés ont été testés dans les conditions réactionnelles standard (**Tableau IV-8**). Dans le cas de l'utilisation de

réducteurs de type thiophénol, d'excellents rendements sont obtenus (**Entrées 1-4**) : 97% à partir du toluènethiol, 94% à partir du thiophénol, du naphthalènethiol ou du 4-bromothiophénol. En revanche, dans le cas du benzylmercaptan, pratiquement aucune réactivité n'est observée (2% de rendement). Cette expérience montre l'importance des facteurs électroniques sur la réactivité, notamment de la possible contribution par mésomérie du nuage électronique du noyau aromatique à la réactivité du thiol.

Tableau IV-8 : Expansion de la gamme de réducteurs soufrés sur la réactivité d'hydrothiolation en présence du complexe de **Fe-LIII**.

Entrée	Substrat	Benzaldéhyde Rdt (%)	Produit 9d Rdt (%)	Disulfure Rdt (%)	Sélectivité ^[a] (%)
1		6	92	23	94
2		6	92	n.d.	94
3		3	97	27	97
4		5	74	2	94
5		2	2	0	50

^[a] Chimiosélectivité en faveur de **9d**/aldéhyde.

En conclusion, une réaction d'hydrothiolation a été développée avec succès avec le complexe **Fe-LIII** avec des substrats dérivés du styrène et du thiophénol. De nombreuses combinaisons peuvent être réalisées entre les différents dérivés menant à une gamme de produits intéressante. Les conditions réactionnelles ont pu être optimisées : le ratio catalyseur/alcène/thiophénol optimal est de 1/1000/1500, à partir du 2-bromostyrène et du thiophénol dans un mélange CH₃CN/H₂O 1/1. De plus, ces différentes expériences ont permis de déterminer quelques points clés du mécanisme réactionnel : (i) l'addition du thiol est 100% régiosélective avec une addition sur la position β du motif styrène et (ii) H₂O posséderait un rôle primordial dans l'activation du thiophénol pour qu'il puisse réagir avec la double liaison de l'alcène. De plus, il a été démontré que le complexe était impliqué dans la catalyse. Les derniers résultats obtenus soulèvent des questionnements sur le mécanisme réactionnel que nous n'avons pas pu aborder.

3-2. Optimisation de la réaction de sulfoxydation

Une première réaction de sulfoxydation avait été développée dans la première tentative de chimie cascade en utilisant le polymère de glutaraldéhyde, formé sur les CLEC au cours de leur réticulation, en présence d' H_2O_2 . La caractérisation et la reproductibilité des résultats de ce polymère étant difficile, une nouvelle réaction de sulfoxydation a été développée en utilisant des complexes déjà décrits dans la littérature.^{3, 116} Notre choix s'est porté sur les complexes développés par Bolm *et al.* à base de vanadium et de ligands chiraux (L4 et L5) (**SchémaIV-9, b**).²²³ Ces catalyseurs ont été choisis car leur synthèse est aisée selon une seule étape d'imination. De plus, leur activité catalytique et leur efficacité en présence d'un oxydant doux H_2O_2 sont intéressantes en milieu organique pur. Au cours de la suite des résultats, les catalyseurs sont synthétisés *in situ* et leur caractérisation n'a pas encore été déterminée. Une étude préliminaire en spectrométrie de masse sur le mélange n'a pas été concluante. Nous nous concentrons donc sur la partie de catalyse *in situ*.

Une première réaction a été testée en utilisant des conditions réactionnelles similaires à la première réaction d'oxydation développée : catalyseur/substrat/ H_2O_2 1/1000/1500, dans le même milieu réactionnel que la réactivité d'hydrothiolation ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1), pendant 5 h sous agitation. Pour cette première catalyse, la réactivité a été testée en présence du produit résultant de la réaction d'hydrothiolation **9d**, substrat de référence, avec différents catalyseurs (**a**).

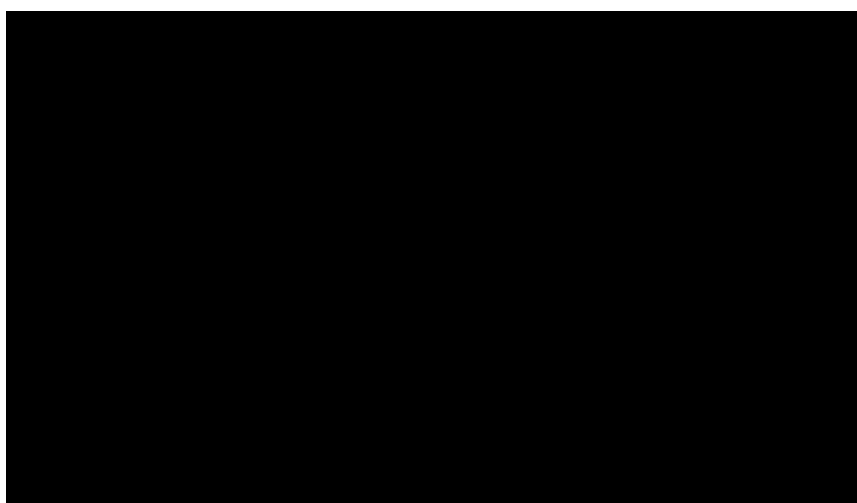


Schéma IV-9 : a) Conditions réactionnelles testées pour la réactivité de sulfoxydation.

b) Ligands utilisés pour la formation des complexes de fer et de vanadium.

Pour cette réactivité, quatre complexes ont été testés : deux complexes de vanadium **VO-L4** et **VO-L5** formés à partir du sel de vanadium $\text{VO}(\text{acac})_2$ et des ligands L4 et L5 et deux complexes de fer formés à partir de FeCl_3 et des mêmes ligands (**Schéma IV-9, b**). Le résultat le plus intéressant est obtenu avec le complexe **VO-L4** qui possède une réactivité moyenne avec un rendement de 25% en sulfoxyde **13d**, une chimiosélectivité de 100% en faveur du sulfoxyde et un excès énantiomérique atteignant les 22% (**Tableau IV-9, entrée 3**). De plus, il est intéressant de constater que le ligand L4 ou le sel de vanadium $\text{VO}(\text{acac})_2$ ne possèdent aucune réactivité (**Entrées 6 et 7**). Il est à noter que lorsque l'ion vanadyle du complexe **VO-L4** est remplacé par un ion ferrique, la réactivité est aussi inhibée (**Entrée 1**). Lorsque la catalyse est réalisée en présence du complexe **VO-L5**, pratiquement aucune activité catalytique n'est observée (**Entrée 4**). Le ligand joue donc aussi un rôle prépondérant dans l'activité catalytique et dans la sélectivité de la réaction. Le solvant est aussi important car ces systèmes catalytiques sont beaucoup moins efficaces dans le mélange $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1 que dans le DCM. Néanmoins, pour des raisons de compatibilité avec la première étape catalytique, ce mélange de solvant est privilégié.

Tableau IV-9 : Réactivité de sulfoxydation avec H_2O_2 sur le substrat **9d**.

<i>Entrée</i>	Catalyseur	Rendement 13d (%)	<i>ee</i> (%)	Sélectivité ^[a]
1	Fe-L4	3	0	100:0
2	Fe-L5	4	0	100:0
3	VO-L4	25	22	100:0
4	VO-L5	4	0	100:0
5	FeCl₃	2	0	100:0
6	VO(acac)₂	3	0	100:0
7	L4	3	0	100:0
8	L5	4	0	100:0

^[a] sulfoxyde : sulfone.

Pour la suite des expériences, l'optimisation de cette réactivité a donc été réalisée sur le complexe **VO-L4**. Pour cela, différentes concentrations en catalyseur ont été testées et comparées (**Figure IV-5**). Comme observée précédemment, la concentration de catalyseur référence (0,1 mol%) permet l'obtention de 25% de rendement en sulfoxyde et un excès énantiomérique atteignant 22%. En augmentant la concentration en catalyseur jusqu'à

0,8 mol%, les rendements sont largement améliorés (93%) tout en gardant la même sélectivité (25% d'*ee* et 100% de chimiosélectivité). En revanche, lorsque la concentration devient trop élevée (1 mol%), les rendements chutent à 75%. Une hypothèse probable serait que la trop haute concentration en catalyseur accélérerait sa dégradation.

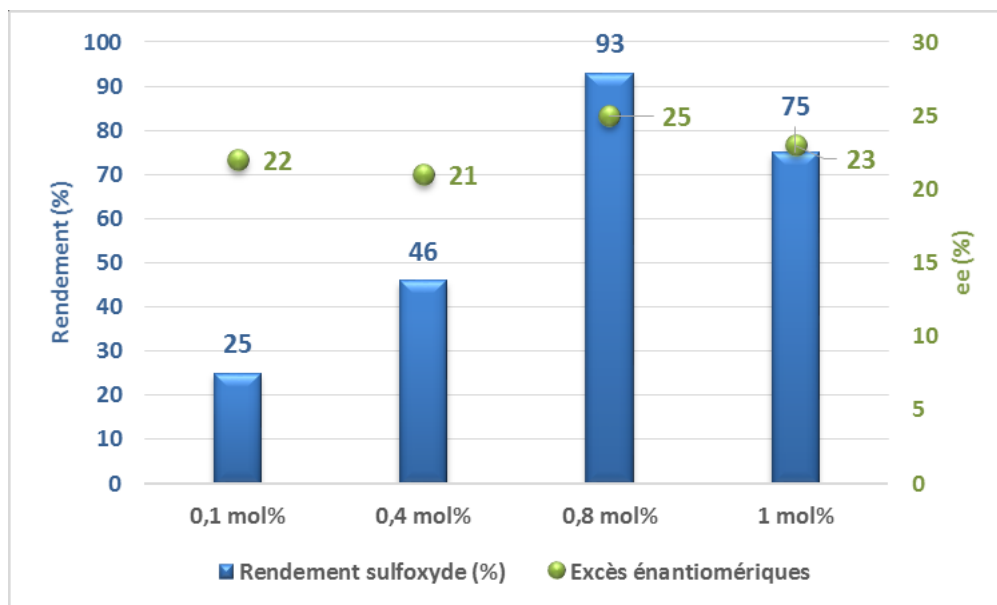


Figure IV-5 : Variation de la concentration en catalyseur VO-L4.

Pour compléter l'optimisation de la réaction de sulfoxydation, la cinétique de la production du sulfoxyde **13d** a été étudiée en présence du complexe **V-L4** à 0,8 mol% (Figure IV-6).

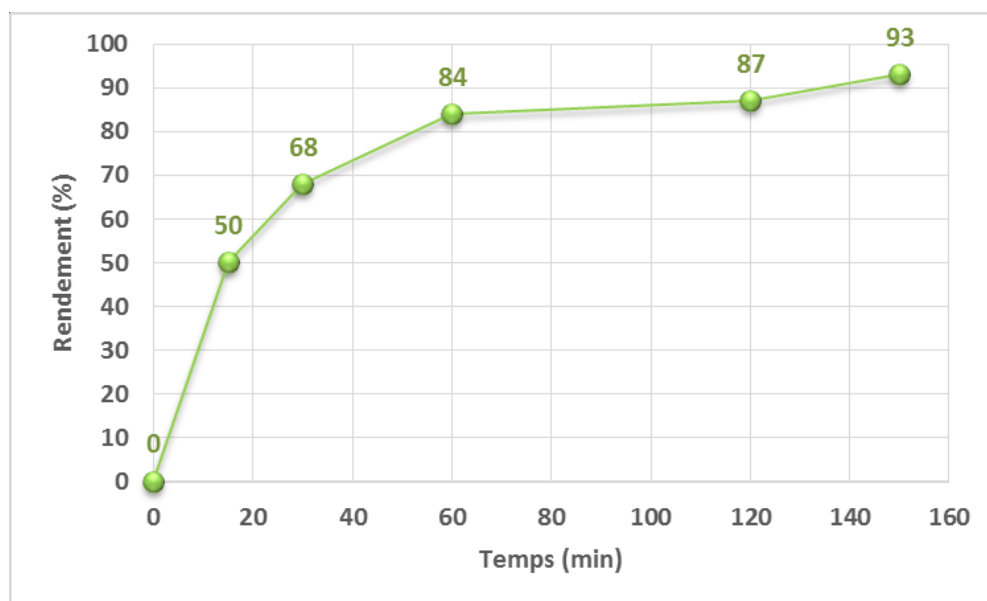


Figure IV-6 : Cinétique de production du sulfoxyde **13d** par VO-L4.

Sur cette courbe de cinétique, deux phases peuvent être observées. Une première phase rapide avec une vitesse atteignant 4 min^{-1} , ce qui permet la production de 50% du sulfoxyde en seulement 15 minutes. La seconde phase est beaucoup plus lente avec la production de 43% du sulfoxyde en 135 minutes. Ces résultats semblent indiquer une dégradation progressive du catalyseur ce qui entraîne une diminution de l'activité catalytique. La production du sulfoxyde est terminée au bout de 150 minutes.

Ensuite, il a fallu déterminer l'orthogonalité des réactions mises en jeu pour réaliser une réaction tandem. Deux expériences témoins ont donc été réalisées en inversant les systèmes catalytiques : (i) la réactivité d'hydrothiolation avec le complexe **VO-L4** et (ii) la réactivité de sulfoxydation avec le complexe **Fe-LIII** (Schéma IV-10).

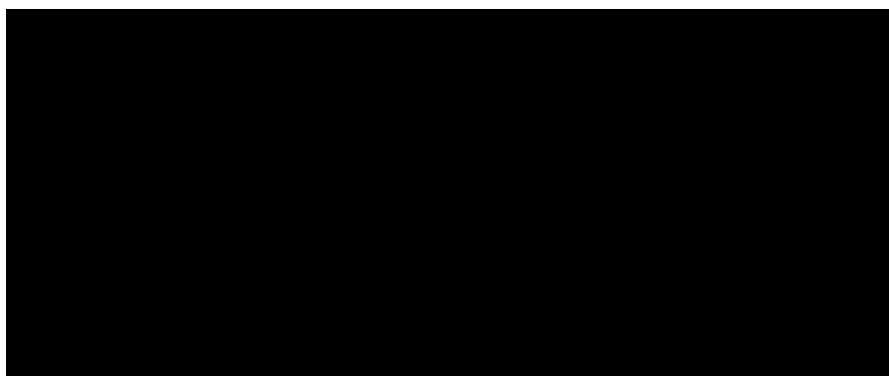


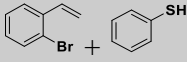
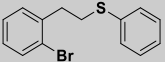
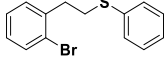
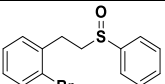
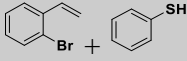
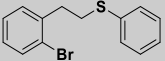
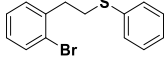
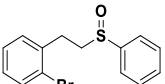
Schéma IV-10 : a) Réactivité d'hydrothiolation en présence du complexe VO-L4. b) Réactivité de sulfoxydation en présence du complexe Fe-LIII.

Pour la réactivité de couplage, le complexe **VO-L4** a une réactivité très faible avec seulement 10% de **9d** formé et une sélectivité très faible en faveur de **9d** (Tableau IV-10). Concernant la réactivité de sulfoxydation, le complexe **Fe-LIII** a une réactivité beaucoup plus faible que le complexe **VO-L4** avec 15% de sulfoxyde **13d** formé. Ces résultats indiquent que les réactions sont orthogonales entre elles ce qui est un point positif pour le développement d'une réaction tandem.

Pour finir, dans la précédente partie, nous avons pu observer que la réaction d'hydrothiolation pouvait être réalisée dans le mélange $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1 ainsi que dans H_2O pure. Afin de discriminer quel solvant utiliser pour la réaction tandem, la catalyse d'oxydation de **9d** a été effectuée dans H_2O pure dans les conditions standard. Lors de cette réaction de catalyse, seulement 8% de sulfoxyde se forme (contre 93% dans $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1) et les excès

énantiomériques ne dépassent pas 16% (contre 25%). Ces résultats traduiraient un manque de solubilité des différents partenaires en milieu aqueux en comparaison d'un milieu semi-organique. Les expériences de chimie tandem seront donc réalisées dans le mélange CH₃CN/H₂O 1/1 en présence du complexe de **Fe-LIII** pour catalyser la réaction de couplage.

Tableau IV-10 : Vérification de l'orthogonalité des deux réactions sur le substrat **9d**.

Entrée	Catalyseur	Substrats	Produit majoritaire	Rendement (%)	ee (%)	Sélectivité (%)
1	Fe-LIII			92	-	92 ^[a]
2	Fe-LIII			15	0	100 ^[b]
3	VO-L4			10	-	11 ^[a]
4	VO-L4			93	25	100 ^[b]

^[a] Chimiosélectivité en faveur du produit d'hydrothiolation. ^[b] Chimiosélectivité sulfoxyde : sulfone.

En conclusion, la réaction de sulfoxydation du thioéther **9d** a été optimisée en présence de 0,8 mol% de complexe **VO-L4** et d'H₂O₂ comme oxydant. D'excellents rendements ont été atteints (93%) avec une très bonne sélectivité (100% chimiosélectivité et 25% d'*ee*). La catalyse a pu être développée dans le même milieu réactionnel que la réaction d'hydrothiolation (CH₃CN/H₂O 1/1) ce qui est un point essentiel pour développer une chimie tandem en combinant ces deux réactivités.

3-3. Combinaison des deux réactivités : développement de la chimie tandem

L'optimisation des deux réactivités effectuée indépendamment, l'étape suivante a été de les combiner dans une réaction tandem dans les conditions réactionnelles du **Schéma IV-11**.

Pour réaliser la réaction tandem, dans un premier temps, le complexe **Fe-LIII** est mis en présence du 2-bromostyrène et du thiophénol dans un mélange CH₃CN/H₂O 1/1 sous agitation pendant 15 minutes. Puis dans un second temps, le complexe **VO-L4** et H₂O₂ sont additionnés

au mélange réactionnel et l'ensemble des réactifs est agité pendant 2h30 (**Tableau IV-11, Entrée 1**).



Schéma V-11 : Conditions réactionnelles de la réaction tandem.

Ensuite, l'influence de chaque catalyseur est étudiée : (i) en absence de **VO-L4** (**Entrée 2**), (ii) en absence de **Fe-LIII** (**Entrée 3**) et (iii) en absence des deux catalyseurs (**Entrée 4**). Pour finir une cinquième réaction est réalisée : la réaction tandem complète en mélangeant tous les constituants dès le début de la réaction (**Entrée 5**).

Tableau IV-11 : Résultats de la réaction tandem à partir du 2-bromostyrène et du thiophénol.

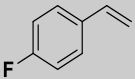
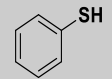
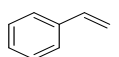
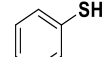
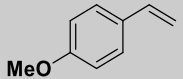
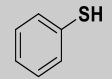
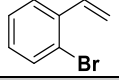
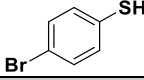
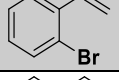
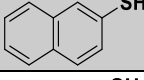
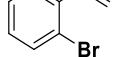
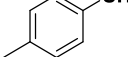
<i>Entrée</i>	Catalyseur(s)	Produit 9d Rdt (%)	Produit 13d Rdt (%)	Taux de conversion (%)	<i>ee</i> (%)
1	Fe-LIII puis VO-L4	41	51	99	35
2	Fe-LIII seul	82	10	99	0
3	VO-L4 seul	3	33	100	25
4	-	3	0	98	0
5	Fe-LIII et VO-L4	3	17	99	26

Il en ressort que pour la réaction tandem standard, 51% de rendement pour le sulfoxyde **13d** sont obtenus avec un excès énantiomérique de 35% (**Entrée1**). Toutefois, l'intermédiaire réactionnel **9d** est obtenu avec un rendement non négligeable de 41%. Ces résultats traduisent que la réaction tandem est réalisable de manière efficace et sélective (92% de rendement global pour les deux produits issus de la réaction). En revanche, la réaction de sulfoxydation dans la réaction tandem est beaucoup moins efficace avec un rendement de 51% alors que la réaction isolée atteint 93%. Ce résultat peut probablement être expliqué par des interférences entre les complexes qui entraîneraient une inhibition partielle de la réactivité de sulfoxydation. En l'absence de **VO-L4** (**Entrée2**), seulement 10% de sulfoxyde est formé attestant que la réaction de sulfoxydation est effectuée par le complexe **VO-L4**. En l'absence de **Fe-LIII** (**Entrée 3**), le sulfoxyde est formé avec un rendement plus faible (33%), un excès énantiomérique moins intéressant (25%) et surtout une chimiosélectivité en faveur de **9d** et

13d de seulement 34% (formation de nombreux produits réactionnels notamment le produit **11d** et ses analogues oxydés). La réaction tandem est donc réalisable mais avec une efficacité et une sélectivité beaucoup moins importante démontrant le rôle crucial de ce catalyseur dans la réaction tandem. En l'absence des deux catalyseurs, aucun des deux produits réactionnels souhaités n'est formé alors que de nombreux autres produits réactionnels sont observés (**Entrée 4**). Enfin, en mélangeant tous les réactifs et catalyseurs dès le début de la réaction, les activités catalytiques et les sélectivités sont très faibles (**Entrée 5**) ce qui suggère une interférence importante entre les deux complexes et les différents réactifs utilisés. Ce premier test est très intéressant puisqu'il permet d'affirmer que la réaction tandem est réalisable de manière efficace et sélective.

Pour la suite, d'autres substrats ont été testés afin d'élargir la gamme de produits formés ainsi que d'observer l'influence des différents substituants présents sur ces substrats (effets électroniques et encombrement). Pour cela, trois autres substrats possédant le motif styrène et trois autres substrats possédant le motif thiophénol ont été testés : le 4-fluorostyrène, le styrène, le 4-méthoxystyrène, le toluèthiol, le naphthalèthiol et le 4-bromothiophénol (**Tableau IV-12**).

Tableau IV-12 : Variations des substrats de départ dans la réaction tandem standard.

Entrée	Alcène	Thiol	Rendement thioéther (%)	Rendement sulfoxyde (%)	Rendements autres (%)	ee (%)
1			35	27	35	32
2			15	78	7	24
3			30	65	5	33
4			55	31	9	12
5			75	16	8	30
6			67	22	9	16

Dans un premier temps, quel que soit le substrat testé, si la catalyse n'est pas réalisée en présence des deux catalyseurs, la réactivité est très faible (entre 2% et 20% de rendements en sulfoxyde). La combinaison du styrène et du thiophénol offre un résultat très intéressant avec

un rendement de 78% en sulfoxyde **13a** avec un excès énantiomérique modéré (24%) (**Entrée 2**). D'après les résultats obtenus, la sulfoxydation du thioéther est l'étape limitante. En effet, pour la majorité des combinaisons testées, le thioéther **9** est formé avec des rendements supérieurs à 85% alors que les rendements pour l'étape de sulfoxydation fluctuent entre 18 et 84% (**Entrées 2-6**). Le manque de stabilité du complexe **VO-L4** dans ces conditions réactionnelles pourraient expliquer cette différence de réactivité lors de la réaction tandem. De plus, la combinaison 4-fluorostyrène/thiophénol montre les limites de la réaction tandem. En effet, 35% d'autres produits réactionnels sont formés alors que pour les autres combinaisons ce rendement ne dépasse pas 10% (**Entrée 1**).

D'après les différents résultats, il est difficile de tirer des conclusions sur les effets électroniques. En présence du thiophénol, l'ordre de réactivité n'est pas complètement logique $4-F < 2-Br < 4-MeO < H$. D'après les effets électroniques, le 4-méthoxystyrène devrait posséder les meilleurs rendements, or ce n'est pas le cas. Une explication plausible serait que le groupement situé en *para* de l'alcène provoquerait un encombrement stérique qui ralentirait la réaction tandem. Dans le cas du changement de thiophénol, le meilleur rendement est obtenu avec le thiophénol possédant un groupement électroattracteur (4-bromothiophénol) avec un rendement en sulfoxyde de 31% (**Entrée 4**). Néanmoins, les excès énantiomérique sont plus faibles (**Entrées 4-6**). De plus, les rendements sont moins élevés que lors de l'utilisation du thiophénol. L'encombrement stérique joue donc certainement un rôle prépondérant dans la réactivité : les substrats substitués en *para* du groupement thiolés sont moins réactifs (rendements $\leq 31\%$) (**Entrées 4-6**).

Pour conclure, les effets électroniques semblent indiquer que la meilleure combinaison possible serait un alcène riche en électrons combiné au thiophénol. Pour que cette combinaison soit efficace, il est nécessaire que les molécules ne possèdent pas de groupements chimiques en *para*. De plus, même en utilisant des substrats plus gros, les excès énantiomériques n'ont pas été améliorés par rapport à la réaction standard (35%).

Les rendements de la réaction tandem étant plafonnés à 51% en sulfoxyde, trois expériences complémentaires ont été entreprises pour les améliorer : (i) augmenter le temps de réaction pour la sulfoxydation, (ii) augmenter la concentration d' H_2O_2 ou (iii) effectuer un deuxième ajout de complexe **VO-L4** (**Figure IV-7**). Concernant la première hypothèse, les conditions réactionnelles testées indépendamment sur la réactivité de sulfoxydation sont différentes de

celles testées pour la réaction tandem complète. En effet, la présence de **Fe-LIII** dans le milieu ainsi que la production de certains composés comme le disulfure ou l'aldéhyde pourraient provoquer des interférences et ralentir la cinétique de la réaction. Pour s'affranchir de ce problème, la réaction tandem a été réalisée sur 5h15 au lieu de 2h45. Dans ce cas, seulement 47% de sulfoxyde est formé et avec un excès énantiomérique moins élevé que pour la réaction standard (17% vs 35%). L'allongement du temps réactionnel n'est donc pas une solution intéressante.

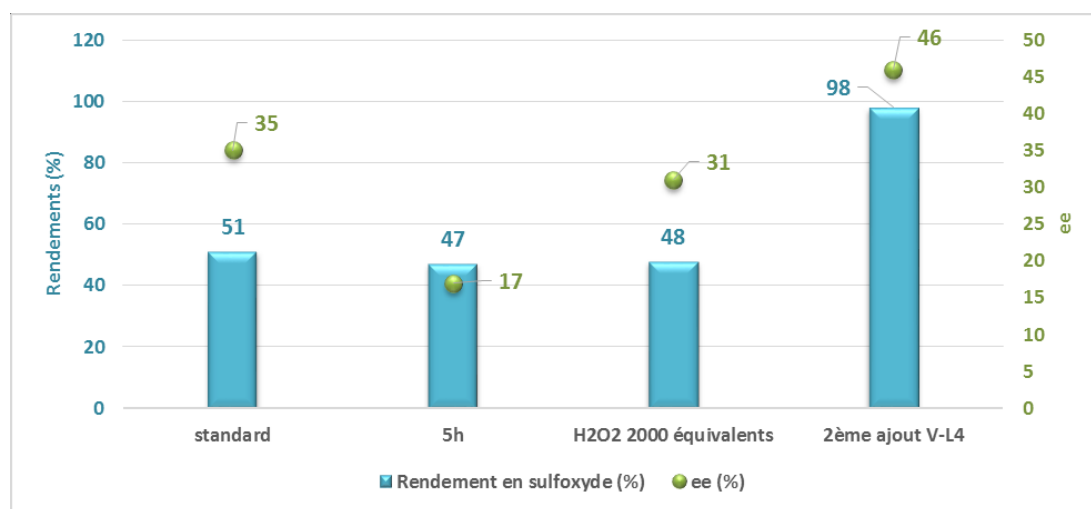


Figure IV-7 : Variations des conditions réactionnelles pour améliorer les rendements en sulfoxyde.

La deuxième hypothèse serait que la concentration d'oxydant ne serait pas suffisante. Par exemple, le complexe **Fe-LIII** pourrait jouer le rôle de catalase en catalysant la dismutation d' H_2O_2 en H_2O et O_2 ce qui entrainerait une diminution conséquente de la quantité d' H_2O_2 disponible pour réaliser la réaction de sulfoxydation.²²⁴ Une expérience de catalyse a donc été réalisée en présence de 2000 équivalents d' H_2O_2 (1500 équivalents dans les conditions réactionnelles standard). Cette catalyse n'a pas eu l'effet escompté puisque le rendement obtenu en sulfoxyde plafonne à 48% avec un excès énantiomérique similaire (31%).

La dernière hypothèse réside dans la dégradation du complexe **VO-L4** au cours de la catalyse à cause notamment de nombreuses interférences possibles avec le complexe **Fe-LIII** ou les différents réactifs et produits présents dans le milieu réactionnel. Pour confirmer ou non cette hypothèse, un deuxième ajout de complexe **VO-L4** est réalisé après 2h45 de réaction et le milieu réactionnel est laissé sous agitation 2h30 supplémentaires. Cette fois ci, des

rendements quantitatifs sont obtenus en sulfoxyde avec un excès énantiomérique atteignant 46%. Ces excellents résultats mettent en avant l'efficacité et la sélectivité de la réaction tandem développée.

Pour aller plus loin, cette réaction tandem a été testée en présence des **CLEC NikA/Fe-LIII**. Pour éviter les interférences possibles entre les complexes qui entraîneraient une légère inhibition de la réactivité, l'utilisation des CLEC permettrait de compartimenter un des deux complexes. La réaction tandem a donc été réalisée dans les conditions réactionnelles standard. En présence des **CLEC NikA/Fe-LIII**, le rendement obtenu en sulfoxyde est plus faible (30% vs 51% avec le complexe seul). De plus, seulement 14% de produit intermédiaire **9d** est formé ce qui signifie que la chimiosélectivité de la réaction est assez faible (46% en faveur des produits réactionnels souhaités). La cinétique de réaction avec les CLEC est probablement plus lente que celle du complexe ce qui permettrait aux produits réactionnels non catalysés d'être formés (comme par exemple le composé **11d**). En effet, il a été démontré que le produit **11d** était formé en absence de catalyseur et en présence d'O₂. La réalisation des catalyses en présence des CLEC en boîte à gants permettrait donc de s'affranchir de cette réaction non catalysée et donc garder une excellente chimiosélectivité.

3-4. Conclusion

Lors de cette étude, une deuxième réaction tandem beaucoup plus efficace et sélective que la première a été développée. En combinant le complexe **Fe-LIII**, réalisant la réaction de couplage, avec le complexe **V-L4**, utilisé pour la sulfoxydation du thioéther formé en présence d'H₂O₂, des rendements quantitatifs ont pu être obtenus avec des excès énantiomériques atteignant les 46%. De plus, cette réaction tandem permet de limiter l'obtention de produits non désirés et d'éviter l'étape de purification du thioéther formé. En perspective, cette réaction tandem pourrait être développée en version hétérogène en incorporant les deux complexes au sein des cristaux d'enzymes pour améliorer la sélectivité de la réaction, la recyclabilité du catalyseur et la stabilité de ces derniers vis-à-vis de la dégradation.

4. Conclusion générale

Deux réactions tandem ont été développées dans ce chapitre. Une première réaction tandem a été réalisée en présence des **CLEC NikA/Fe-L2** pour réaliser la coupure oxydante d'alcène en présence d'O₂ et de DTT suivie d'une réaction de sulfoxydation en présence d'H₂O₂. Pour cette réactivité, il a été mis en évidence que les **CLEC NikA/Fe-L2** possédaient deux centres actifs distincts : un site actif au niveau du complexe **Fe-L2** catalysant la coupure oxydante et un site actif au niveau des liaisons imines formées lors de la réticulation du glutaraldéhyde. Ces liaisons imines, en présence d'H₂O₂, catalysent la sulfoxydation de thioéthers. Malheureusement, cette première réaction tandem est assez peu efficace puisque seulement 9% du produit attendu sont formés. Ce faible rendement provient, entre autres, d'une réaction secondaire, la réaction d'hydrothiolation entre le réducteur (DTT) et l'alcène de départ. En s'inspirant de ces résultats, une deuxième réaction tandem a été développée en combinant le couplage d'un alcène de type styrène avec un thiol de type thiophénol et la sulfoxydation du thioéther formé en présence d'H₂O₂. Après optimisation, des rendements quantitatifs et de très bonnes sélectivités sont obtenues (92% chimiosélective en faveur du produit sulfoxyde désiré et 46% d'excès énantiomériques). Une catalyse hétérogène utilisant les CLEC est en cours de d'optimisation afin de compartimenter les deux catalyseurs pour éviter les interférences et améliorer la stabilité et la recyclabilité de ce système catalytique. De plus, le mécanisme réactionnel doit encore être déterminé.

Références

1. J. H. Sattler, M. Fuchs, K. Tauber, F. G. Mutti, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas and W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**, 9156-9159.
2. J.-C. Wasilke, S. J. Obrey, R. T. Baker and G. C. Bazan, *Chem. Rev*, 2005, **105**, 1001-1020.
3. S. P. France, S. Hussain, A. M. Hill, L. J. Hepworth, R. M. Howard, K. R. Mulholland, S. L. Flitsch and N. J. Turner, *ACS Catal.*, 2016, **6**, 3753-3759.
4. J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall and W. Kroutil, *Chem. Rev*, 2018, **118**, 270-348.
5. T. Tamai, K. Fujiwara, S. Higashimae, A. Nomoto and A. Ogawa, *Org. Lett.*, 2016, **18**, 2114-2117.
6. T. Tamai and A. Ogawa, *JOC*, 2014, **79**, 5028-5035.
7. L. Dimitris and K. C. G., *Adv. Synth. Catal.*, 2017, **359**, 323-328.
8. B. C. Ranu and T. Mandal, *Synlett*, 2007, **2007**, 0925-0928.
9. K. P. Bryliakov, *Chem. Rev*, 2017, **117**, 11406-11459.
10. E. Wojaczyńska and J. Wojaczyński, *Chem. Rev*, 2010, **110**, 4303-4356.
11. C. Bolm and F. Bienewald, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1996, **34**, 2640-2642.
12. M. Alfonso-Prieto, X. Biarnés, P. Vidossich and C. Rovira, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 11751-11761.

Conclusion générale

Dans le cadre d'une recherche de nouvelles méthodologies en catalyse selon une approche bio-inspirée, mon projet de thèse a permis d'aborder trois voies de recherches autour de réactions d'oxydation :

1. La conception de nouvelles métalloenzymes artificielles à base de Ru ou Fe.
2. Le développement de biocatalyseurs hétérogènes à partir de métalloenzymes artificielles déjà développées ou non au laboratoire.
3. La mise au point d'une chimie tandem à partir des différents types de catalyseurs développés au laboratoire ou durant ma thèse.

Dans un premier temps, l'objectif était de concevoir un premier hybride en insérant un complexe de cuivre connu de nos partenaires, pour l'activation d'O₂, au sein des protéines NikA ou HSA pour l'oxydation de l'alcool benzylique dans le cadre d'une collaboration avec V. Blandin et ses collaborateurs du Département de Chimie Moléculaire de Grenoble. Or, cette étude n'a pas eu les résultats escomptés avec l'absence de réactivité due certainement à une interaction plus importante cuivre/protéine plutôt que complexe/protéine. Dans un second temps, un deuxième hybride a été développé en ancrant le complexe **Ru-bpza** au sein de la protéine NikA. La catalyse d'oxydation d'alcènes en présence de PIDA et d'une source de chlore a permis de mettre en évidence deux réactivités distinctes d'époxydation et d'hydroxychloration en fonction de la nucléophilie de la double liaison du substrat. De plus, les différentes caractérisations spectroscopiques, cristallographiques et spectrométriques réalisées sur l'hybride mettent en avant le rôle de la protéine dans l'activation du complexe inorganique en lui conférant une nouvelle réactivité non naturelle. Cependant, la conception de métalloenzymes artificielles se confronte à quelques difficultés qu'il est nécessaire de prendre en considération dans le cadre d'un éventuel développement industriel. Dans un premier temps, les complexes inorganiques choisis pour l'ancrage doivent garder leur intégrité c'est-à-dire que l'affinité de l'ion métallique pour les ligands doit être plus forte que celle pour les acides aminés de la protéine. Deuxièmement, la protéine choisie doit être stable vis-à-vis des conditions réactionnelles (température, oxydant, tampons, etc...). Troisièmement, la mise au point de réactions avec les hybrides reste fastidieuse. En effet, de légères fluctuations dans les conditions réactionnelles mises en place peuvent influencer grandement les rendements et les sélectivités de la réaction. Par exemple, un changement de lots de protéine, de complexe, d'oxydant ou encore de tampons, peut entraîner une diminution importante des rendements. Pour développer des métalloenzymes artificielles au niveau industriel, il est donc nécessaire d'améliorer leur stabilité en conditions réactionnelles.

Dans cette optique de stabilisation, le deuxième objectif de ma thèse était de développer une catalyse hétérogène à base de cristaux réticulés de métalloenzymes artificielles. Pour cela, les cristaux ont été stabilisés par la technologie CLEC. La richesse de cette approche repose sur l'utilisation d'un matériau mésoporeux fonctionnel participant à l'activation du catalyseur. Par exemple, les hybrides **NikA/Fe-L2** ne possèdent aucune réactivité d'hydroxychloration d'alcènes en présence d'Oxone® et d'une source de chlore. En revanche, l'utilisation du nouveau matériau mésoporeux constitué de cristaux de **NikA/Fe-L2** confère une activité catalytique efficace. L'hétérogénéisation de ces systèmes catalytiques permet donc la découverte de nouvelles réactivités non existantes en solution. Pour ce projet, seulement quelques résultats préliminaires avaient été obtenus avant le début de ma thèse : la réactivité *in crystallo* avec des hybrides à base de NikA et de complexes de fer est possible et la stabilisation de ces cristaux d'hybrides par réticulation en utilisant du glutaraldéhyde. A partir de ces résultats, il a fallu développer entièrement le projet : (i) la synthèse de nouveaux ligands et de nouveaux complexes, (ii) la conception des différentes métalloenzymes artificielles en solution et sous leur forme cristalline ainsi que leurs différentes caractérisations, (iii) la mise en place des conditions de réticulation pour la production des différents CLEC ainsi que leurs caractérisations et (iv) le développement de nouvelles réactivités d'oxydation. Au total, trois réactivités ont été développées : la sulfoxydation de thioéthers, l'hydroxychloration d'alcènes et la coupure oxydante d'alcènes. Pour développer ces différentes réactivités, deux stratégies ont été employées : soit, la transposition d'une réactivité déjà développée avec un hybride en solution, soit la découverte d'une nouvelle réactivité. L'utilisation des CLEC permet de combiner les avantages des trois modes de catalyse. Premièrement, la sélectivité et l'efficacité catalytique de la biocatalyse avec des chimio-, régio- et stéréosélectivités de 100% dans la majorité des réactions testées ainsi que des vitesses maximales pouvant atteindre 500 min⁻¹. Deuxièmement, la stabilité et la recyclabilité de la catalyse hétérogène en réutilisant les mêmes CLEC plus de 50 fois sans aucune perte d'activité catalytique permettant d'atteindre 30 000 TON dans certains cas. De plus, les CLEC peuvent être utilisés dans des conditions plus drastiques : solvants organiques, pH acides, hautes températures. Finalement, ils possèdent la versatilité et la diversité de la catalyse homogène, comme le montre les **CLEC NikA/Fe-L2** capables de réaliser différentes réactivités sur le même substrat en changeant uniquement le type d'oxydant. En revanche, leur préparation est chronophage : nécessité de purifier la protéine, de concevoir et de cristalliser les hybrides, de réticuler les cristaux obtenus et de les isoler pour qu'ils soient prêts à l'emploi. De plus, l'utilisation d'oxydants forts est à proscrire puisqu'ils dégradent

rapidement les différents constituants du système catalytique. Par ailleurs, les excès énantiomériques obtenus sont assez faibles, probablement dus à la taille de la cavité protéique trop importante, ce qui limite leur emploi au niveau industriel. Quelques améliorations peuvent être alors proposées afin de rendre le système CLEC basé sur la protéine NikA plus viable pour un développement industriel pour le futur. Concernant la préparation de ces catalyseurs, l'utilisation de nouvelles technologies et de robots permettraient de produire ces CLEC plus aisément. Par exemple, des systèmes d'automatisation de l'étape de cristallisation, du trempage des différents complexes, de l'ajout de l'agent réticulant et de la récupération des cristaux réticulés formés pourraient être mis en place. Pour éviter la dégradation des CLEC, il serait judicieux de choisir des complexes inorganiques capables d'activer des oxydants doux. De plus, pour rendre le système encore plus attractif, il serait judicieux de viser des réactivités d'intérêt pour les industriels comme par exemple la dégradation des HAP, le traitement des eaux usées, la dégradation de la biomasse ou encore des réactions d'oxydation pour la production de médicaments (époxydation, sulfoxydation, etc...). Généralement, dans le domaine de l'industrie pharmaceutique, l'obtention de médicaments énantiopurs est un des principaux challenges à relever. Avec le système CLEC à base de la protéine NikA, il est donc nécessaire d'améliorer l'énantiosélectivité de la réaction pour répondre à ces exigences. Pour cela, une approche d'évolution dirigée de l'environnement protéique peut être envisagée. D'un point de vue plus général, la technologie CLEC est encore peu utilisée avec l'existence d'une seule entreprise vendant des CLEC pour un secteur de marché très spécifique (Altus Biologics). Par contre, celle-ci pourrait largement se développer dans les années à venir, notamment grâce à la robotisation et au développement de nouvelles technologies. Les CLEC pourraient donc avoir un bel avenir devant eux si on leur donne les moyens : en effet, l'augmentation de la stabilité d'enzymes (naturelles ou non) pourrait être une solution aux problèmes liés à leur utilisation au niveau industriel. En revanche, à l'heure actuelle, cela n'est efficace qu'avec des oxydants doux ou sur des réactions non destructrices (hydrogénation, etc...) limitant le champ de réactions possibles. Des efforts doivent donc encore être produits pour être encore plus applicables à tous types de conditions, notamment pour des réactions d'oxydation. Pour étendre le champ de réactions réalisables avec ces systèmes CLEC, une des solutions envisagées serait d'explorer la biodiversité. En effet, il existe un nombre incalculable d'enzymes possédant des propriétés hors du commun. Par exemple, nous pourrions sélectionner des enzymes d'organismes thermophiles (température élevée) ou psychrophiles (température faible proche de 0°C), halophiles (forte concentration en sels), alkaliphiles (pH supérieur à 10) ou acidophiles (pH inférieur à 1), ou encore

piézophiles (forte pression). Evidemment, quelques paramètres sont à prendre en considération : (i) la protéine doit cristalliser, (ii) le complexe choisi doit être capable d'être ancré au sein de la protéine avec une bonne affinité et (iii) les conditions réactionnelles doivent être compatibles avec les différents constituants du système. Si toutes ces conditions sont réunies, avec un système de criblage simple et efficace, de nombreuses combinaisons protéine/complexe pourraient être testés permettant de sélectionner beaucoup plus rapidement et efficacement les systèmes CLEC intéressants à développer au niveau industriel.

Pour aller encore plus loin, mon dernier projet proposait d'explorer le domaine de la chimie tandem en utilisant les systèmes catalytiques CLEC développés précédemment. Généralement en catalyse tandem, un des problèmes récurrents est l'inhibition entre catalyseurs. L'utilisation des CLEC avait pour objectif de compartimenter les différents catalyseurs mis en jeu au sein de cristaux afin d'éviter ces interférences. Pour cela, une première réaction tandem a été réalisée en combinant deux des trois réactivités mises au point au chapitre précédent (la sulfoxydation et l'activation d'O₂). Des résultats modérés en termes d'activité catalytique et de sélectivités ont été obtenus ce qui est dû à la présence d'une réaction secondaire de d'hydrothiolation entre le groupement thiol du DTT et l'alcène qui diminue fortement la chimiosélectivité de la réaction. En s'inspirant de ce résultat, une deuxième réaction tandem a été développée en combinant la réactivité d'hydrothiolation avec la sulfoxydation du thioéther formé. Pour cela, la mise au point de cette réaction a d'abord été réalisée en conditions homogènes avec le complexe de **Fe-LIII** (hydrothiolation), synthétisé pendant ma thèse, et un complexe de vanadium (**VO-L4**) connu pour former des sulfoxydes énantiosélectifs en présence d'H₂O₂. Des résultats prometteurs ont montré la capacité de ce système catalytique a réalisé la réaction tandem de manière efficace et sélective. En revanche, la difficulté d'un tel projet réside dans la recherche de conditions réactionnelles compatibles pour chacune des réactions mises en jeu (solvants, réactifs, températures, etc...). Pour cette thématique, il est donc nécessaire de choisir avec précaution les systèmes catalytiques mis en jeu, leur compatibilité en termes de conditions réactionnelles et leur capacité à ne pas interagir entre eux. Par la suite, la deuxième réaction tandem doit encore être développée avec des CLEC afin d'apporter les bénéfices de ces systèmes catalytiques dans le développement de la chimie tandem. En perspectives à court terme, l'équipe BioCE du laboratoire aimerait développer une chimie en cascades d'oxydation hétérogène avec, au sein des mêmes CLEC, plusieurs sites actifs différents permettant de réaliser la réaction tandem complète au sein du même cristal. En perspectives à long terme, ce type de catalyse hétérogène impliquant des réactions

cascades pourrait être développé en combinant différents types de réactivités avec différents jeux de CLEC. Cela pourrait permettre de créer de nouvelles voies métaboliques non naturelles, combinant les avantages des trois modes de catalyse et permettant la production de n'importe quel type de composés. L'objectif est d'être capable de synthétiser des molécules complexes d'intérêt, comme par exemple des médicaments ou des produits naturels rares, sans la nécessité de purifier le milieu réactionnel à chaque étape avec un gain de temps et d'argent considérable. De plus, la stabilité et la recyclabilité des CLEC pourraient permettre de réaliser plusieurs synthèses différentes, juste en changeant les conditions réactionnelles.

En conclusion, l'interface de la chimie/biologie est très présente dans ce projet de thèse. La combinaison de ces deux mondes permet d'ouvrir de nouvelles portes dans le domaine de la recherche scientifique. Sans les bénéfices de ces deux mondes, la conception de nouveaux systèmes originaux, comme les CLEC de métalloenzymes artificielles, n'aurait pu être possible. Evidemment, cela demande un fort investissement avec la compréhension de deux domaines dont le fonctionnement est fondamentalement très différent. Mais, travailler à l'interface chimie/biologie est très enrichissant et permet de développer des nombreuses compétences variées ainsi qu'une grande ouverture d'esprit sur les autres domaines scientifiques. Il n'y a pas de sciences parfaites permettant de résoudre tous les problèmes, en revanche, la combinaison de toutes les sciences existantes offre des opportunités infinies à développer.

Partie expérimentale

Partie Expérimentale

1. Procédures générales

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

Les **spectres RMN (^1H et ^{13}C)** ont été enregistrés 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 des abréviations : s = singulet, d = doublet, dd = doublet de doublet t = triplet, sl = singulet large, q = quadruplet, m = multiplet pour une multiplicité > 4 .

Les **spectres de résonance paramagnétique électronique (RPE)** ont été obtenus en utilisant un spectrophotomètre Brüker EMX équipé d'un cryostat Oxford ESR 910 pour les études à basses températures. Les simulations sont obtenues en utilisant le programme EasySpin.²²⁵ Les spectres obtenus sont traités en utilisant le logiciel WIN-EPR (Brüker).

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

Les **spectres UV-visible** ont été réalisés sur un appareil Shimadzu UV-1800 dans des cuves de 1 cm de trajet optique.

Les **spectres infra-rouge** ont été enregistrés sur un appareil à transformée de Fourier (**IRTF**) Excalibur FTS-3500. Les solides sont dispersés dans une matrice de KBr. Un appareil Perkin-Elmer à onde continue équipé d'une réflectance totale atténuée (**ATR**) a été utilisé pour les hybrides en solution.

Les **études par spectrométrie à plasma à couplage inductif à émission atomique (ICP-AES)** ont été réalisées sur un appareil Shimadzu ICP 9000 avec une mini torche à plasma).

Les **analyses chromatographiques en phase gazeuse (GC)** ont été effectuées sur un appareil Perkin-Elmer Clarus 580 avec un détecteur FID utilisant une colonne Optima 17. L'appareil de GC est équipé d'un spectromètre de masse (**MS**) Perkin Elmer Clarus SQ8S utilisant une colonne Optima 17. Les analyses GC/MS ont été réalisées avec les cinq programmes suivants :

- **Programme A** : la température du programme commence à 65°C pendant 3 min puis est incrémentée de 16°C par min jusqu'à 200°C pour une période totale de 18 min.
- **Programme B** : la température du programme débute à 130°C pour 3 min puis est incrémentée de 30 °C par min jusqu'à 250 °C pour une période totale de 12 min.
- **Programme C** : la température du programme commence à 130°C pour 2 min puis est incrémentée de 30°C par min jusqu'à 250°C pour une période totale de 15 min.
- **Programme D** : la température du programme débute à 160°C pour 2 min puis est incrémentée de 30°C par min jusqu'à 300 °C pour une période totale de 15 min.
- **Programme E** : la température du programme débute à 160°C pour 2 min puis est incrémentée de 30°C par min jusqu'à 300 °C pour une période totale de 30 min.

L'identification des produits est issue de la comparaison avec des produits purs et avec les traces MS utilisant la base de données NIST.

Les **analyses chromatographiques en phase liquide (HPLC)** ont été effectuées sur un appareil Hewlett Packard 1100 instrument avec un détecteur FID utilisant différentes colonnes en fonction des composés à séparer. Les analyses HPLC ont été réalisées avec les sept programmes suivants :

- **Programme 1** : Elution avec un mélange hexane/isopropanol 90/10 avec un débit de 0,25 mL.min⁻¹ sur une colonne Chiralcel OD (25 cm x 0,46 cm).
- **Programme 2** : Elution avec un mélange hexane/éthanol/isopropanol 85/5/10 avec un débit de 1 mL.min⁻¹ sur une colonne Whelk O2 (25 cm x 0,46 cm).
- **Programme 3** : Elution avec un mélange hexane/éthanol/isopropanol 80/10/10 avec un débit de 1 mL.min⁻¹ sur une colonne Whelk O2 (25 cm x 0,46 cm).
- **Programme 4** : Elution avec un mélange hexane/éthanol 90/10 avec un débit de 2 mL.min⁻¹ sur une colonne Whelk O2 (25 cm x 0,46 cm).
- **Programme 5** : Elution avec un mélange hexane/isopropanol 95/5 avec un débit de 1 mL.min⁻¹ sur une colonne Chiralcel OD (25 cm x 0,46 cm).
- **Programme 6** : Elution avec un mélange hexane/isopropanol 98/2 avec un débit de 0,25 mL.min⁻¹ sur une colonne Chiralcel OD (25 cm x 0,46 cm).

- **Programme 7** : Elution avec un mélange hexane/isopropanol 90/10 avec un débit de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ sur une colonne Chiralcel OD (25 cm x 0,46 cm).

Préparation des tampons

Les tampons HEPES (10 mM, pH 7,0 ou 7,5), Tris-HCl (40 mM, pH 7,5 ou 100 mM, pH 7,0), sulfate d'ammonium (3,5 M, pH 7,0) et acétate de sodium (1 M, pH 4,6) sont préparés selon les modes opératoires conventionnels.

Deux mélanges de tampon sont préparés selon les modes opératoires suivants :

- Tampon de cristallisation : 243 μL de sulfate d'ammonium (3,5 M, pH 7,0) + 50 μL d'acétate de sodium (1 M, pH 4,6) + 207 μL d'eau milliQ.

Concentrations finales : sulfate d'ammonium à 1,7 M et acétate de sodium à 100 mM.

- Tampon A : 300 μL de sulfate d'ammonium (3,5 M, pH 7,0) + 50 μL d'acétate de sodium (1 M, pH 4,6) + 150 μL d'eau milliQ.

Concentrations finales : sulfate d'ammonium à 2,1 M et acétate de sodium à 100 mM.

Le tampon A est utilisé pour réaliser l'ajout de complexe dans la goutte de cristallisation et pour la réticulation des cristaux de la protéine NikA.

Méthode de cristallisation

La protéine apo-NikA est surproduite dans le cytoplasme d'*Escherichia coli* selon le protocole décrit dans la publication de 2008 de C. Cavazza²²⁶, avec un rendement final de 300 mg de protéine pure par litre de culture. La technique de cristallisation utilisée est celle de la diffusion de vapeur en goutte suspendue (**Figure V-1**).

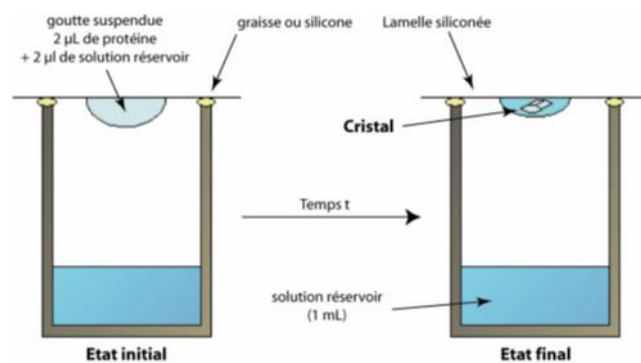


Figure V-1 : Schéma du principe de la diffusion de vapeur en goutte suspendue.

Avant la cristallisation, la protéine est incubée avec deux équivalents de complexe de **Fe(III)-EDTA**. Les gouttes suspendues sont préparées en mixant 2 μL d'une solution de **NikA/Fe-**

EDTA à 8,5 mg.mL⁻¹, contenue dans le tampon Tris-HCl 40 mM pH 7,5, avec 2 µL de tampon de cristallisation (acétate de sodium 100 mM pH 4,7 et sulfate d'ammonium 1,7 M), déposées sur une lamelle siliconée. La lamelle est ensuite retournée et vissée sur un puits contenant 500 µL de solution réservoir de tampon de cristallisation. La différence de concentration en agent précipitant entre la goutte et le réservoir va progressivement s'équilibrer grâce à des échanges par diffusion de vapeur. Comme le volume du réservoir est très supérieur à celui de la goutte, le volume de cette dernière va diminuer et sa concentration en agent précipitant augmenter, jusqu'à atteindre un phénomène de nucléation, conduisant à l'apparition de cristaux. Dans le cas de **NikA/Fe-EDTA**, des cristaux orthorhombiques reproductibles apparaissent au bout d'une semaine.

Les **données cristallographiques** sont collectées sur les lignes de lumière ID29 et BM-30A de l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) à Grenoble. La réduction des données a été effectuée à l'aide du logiciel XDS.²²⁷ Les **structures cristallographiques** sont résolues avec un logiciel PHASER²²⁸ par la méthode de remplacement moléculaire utilisant les coordonnées atomiques du modèle des rayons X de l'hybride NikA/Fe-EDTA(H₂O)⁻ (PDB ID code 1z1q). Les affinements cristallographiques sont conduits par les logiciels Phenix²²⁹ et REFMAC²³⁰ et les modèles en trois dimensions sont examinés et modifiés grâce au programme graphique Coot.²³¹

Les **études de spectrométrie native**²³² ont été réalisées par Elisabetta Boeri-Erba de l'IBS (Institut de Biologie Structurale de Grenoble). Les ions protéiques sont générés par nano-ESI comme source. Les analyses de masse sont réalisées avec par un spectromètre de masse à temps de vol (Q-TOF). Les paramètres instrumentaux suivants ont été utilisés : tension capillaire = 1,2-1,3 kV, potentiel de cône = 40 V, énergie de collision = 30 V. Tous les spectres de masse sont calibrés avec un étalon externe, l'iodure de césium (6 mg.mL⁻¹ dans une solution d'isopropanol/H₂O 1/1) et ont été interprétés sur le logiciel Masslynx 4.0.

SEC-MALLS (Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la dispersion de la lumière laser multi-angulaire). 20 µL de cristaux solubilisés dans de l'eau sont injectés manuellement dans un système SEC-MALLS (Wyatt Dawn HELEOS-II), en utilisant une colonne à exclusion stérique Superdex 200 10/300 (GE Healthcare), éluée avec un tampon Tris 40 mM pH 7,5, NaCl 150 mM. Les données sont analysées grâce au logiciel ASTRA et les concentrations en protéine sont déterminées par intégration de l'indice de réfraction.

Les **réactions de catalyse** sont réalisées dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, fermés et sont agités au vortex avec un agitateur de tubes Heidolph Vortex Reax Control avec un support en mousse pour 10 tubes Eppendorf à 500 tours/minute.

2. Métalloenzyme artificielle à base de cuivre

2-1. UV-visible du système catalytique Cu/bipyridine en présence de la protéine HSA

Dans un premier temps, une solution du système catalytique Cu/bipyridine/NMI/TEMPO à 2 mM est préparé selon le mode opératoire suivant : dans un Eppendorf, sont ajoutés successivement, 5 μL d'une solution de Cu(OTf) à 0,1 M (1 éq.) dans CH_3CN , 5 μL de ligand à 0,1 M (1 éq.) dans CH_3CN , 10 μL de NMI à 0,1 M (2 éq.) dans CH_3CN , 5 μL de TEMPO à 0,1 M (1 éq.) dans CH_3CN et 225 μL de tampon HEPES 10 mM pH 7,0.

Dans un deuxième temps, les expériences en absence de protéine sont réalisées. Pour cela, dans un Eppendorf, sont additionnés, 50 μL de la solution du système catalytique à 2 mM et 50 μL de tampon HEPES 10 mM pH 7,0 (concentration finale = 1 mM). Après 30 minutes d'incubation, un spectre d'absorbance est réalisé de 350 à 800 nm.

Dans un troisième temps, les expériences sont effectuées en présence de HSA. Pour cela, dans un Eppendorf, sont additionnés, 50 μL de la solution du système catalytique à 2 mM (1 éq.) et 50 μL de HSA à 2 mM dans le tampon HEPES 10 mM pH 7,0 (1 éq.) (Concentration finale = 1 mM). Après 30 minutes d'incubation, un spectre d'absorbance est réalisé de 350 à 800 nm.

2-2. Procédures catalytiques

2-2-1. Procédure standard de référence d'activation d' O_2

Les catalyses sont réalisées avec un ratio Cu/ligand/NMI/TEMPO/substrat de 1/1/2/1/20. La catalyse est réalisée dans CH_3CN . La concentration en catalyseur est de 0,1 M.

Dans un tube à essai de 25 mL, sont ajoutés successivement 200 μL de NMI à 0,1 M (2 éq.) dans CH_3CN , 100 μL de bipyridine à 0,1 M (1 éq.) dans CH_3CN , 100 μL de TEMPO à 0,1 M (1 éq.) dans CH_3CN , 100 μL de Cu(OTf) à 0,1 M (1 éq.) dans CH_3CN , 300 μL de CH_3CN et 200 μL d'alcool benzylique à 1 M (20 éq.) dans CH_3CN pour un volume réactionnel de 1 mL. Le tube à essai est bouché avec un septum. Une seringue de 20 mL remplie d' O_2 est additionnée à travers le septum (1 bar). Le milieu réactionnel est agité pendant 20 min. Ensuite, une goutte du milieu réactionnel est prélevée, diluée dans du CDCl_3 et analysée en RMN.

2-2-2. Procédure générale d'activation d'O₂ en milieu aqueux

Les catalyses sont réalisées avec un ratio Cu/ligand/NMI/TEMPO/substrat de 1/1/2/1/20. La concentration en catalyseur est 14 fois moins élevée (0,715 mM). La catalyse est réalisée dans H₂O/CH₃CN 95/5.

Dans un tube à essai de 25 mL, sont ajoutés successivement 100 µL de NMI à 0,1 M (2 éq.) dans CH₃CN, 50 µL de ligand à 0,1 M (1 éq.) dans CH₃CN, 50 µL de TEMPO à 0,1 M (1 éq.) dans CH₃CN, 50 µL de Cu(OTf) à 0,1M (1 éq.) dans CH₃CN, 6,65 mL d'H₂O distillée et 100 µL d'alcool benzylique à 1 M (20 éq.) dans CH₃CN pour un volume réactionnel de 7 mL. Le tube à essai est bouché avec un septum. Une seringue de 20 mL remplie d'O₂ est additionnée à travers le septum (1 bar). Le milieu réactionnel est agité pendant 16 h. Ensuite, le mélange réactionnel est extrait avec 5 mL d'AcOEt, la phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est analysé en RMN.

En comparaison, la même expérience peut être réalisée dans 6,65 mL de CH₃CN ou dans 6,65 mL du tampon HEPES 10 mM pH 7,0 à la place de H₂O distillée.

2-2-3. Procédure générale d'activation d'O₂ en présence d'HSA

Les catalyses sont réalisées avec un ratio Cu/ligand/NMI/TEMPO/substrat de 1/1/2/1/100. La concentration en catalyseur est de 0,143 mM. La catalyse est réalisée dans H₂O/CH₃CN 95/5.

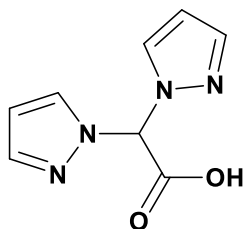
En premier lieu, le mélange catalytique à base de cuivre à 5 mM est préparé : 5 µL de Cu(OTf) à 0,1 M (1 éq.) dans CH₃CN, 5 µL de ligand à 0,1 M (1 éq.) dans CH₃CN, 10 µL de NMI à 0,1 M (2 éq.) dans CH₃CN, 5 µL de TEMPO à 0,1 M (1 éq.) dans CH₃CN et 75 µL de CH₃CN pour un volume total de 100 µL.

Dans un Eppendorf, sont additionnés dans l'ordre, 21,5 µL de HSA à 1 mM dans le tampon HEPES 10 mM pH 7,0 (1 éq.), 122 µL de tampon HEPES 10 mM pH 7,0, 4,3 µL du mélange catalytique à base de cuivre à 5 mM (1 éq.) dans CH₃CN et 2,14 µL d'alcool benzylique à 1 M (100 éq.) dans CH₃CN pour un volume réactionnel de 150 µL. Le milieu réactionnel est agité pendant 16 h à température ambiante puis 5 µL de benzophénone à 0,1 M dans le DCE sont additionnés et le mélange réactionnel est extrait avec 200 µL d'AcOEt et analysé en GC/MS.

3. Métalloenzyme artificielle à base de ruthénium

3-1. Synthèse

3-1-1. Synthèse du complexe $\text{Ru}(\text{bpza})\text{Cl}(\text{CO})_2$ ¹⁸³



Ligand HBpa

Le ligand Hbpa a été synthétisé par notre collaborateur N. Burzlaff.¹⁸³

Une solution de Hbpa (1 mmol ; 1 éq.) dans 20 mL de THF est traitée avec 112 mg de *tert*-butylate de potassium (1 mmol ; 1 éq.) et agitée pendant 2 h à température ambiante. Après l'addition de 193,2 mg de $[\text{RuCl}(\text{CO})_2]$ (1 mmol ; 1 éq.), le milieu réactionnel est chauffé à reflux et l'avancement de la réaction est contrôlé par spectroscopie infra-rouge. Après 24 h de réaction, le précipité blanc formé est filtré, lavé avec H_2O (2 x 10 mL) puis l' Et_2O (3 x 10 mL) et séché *in vacuo*.

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ : 8,50 (d, 1H), 8,46 (d, 1H), 8,45 (d, 1H), 8,24 (d, 1H), 7,64 (s, 1H), 6,74 (t, 1H), 6,69 (t, 1H).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz), δ : 194,8 ; 193,9 ; 163,6 ; 148,1 ; 144,7 ; 135,5 ; 134,5 ; 109,1 ; 108,7 ; 73,2.

IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ 3121 (w, CH), 2996 (w, CH), 2081 (s, CO), 2014 (s, CO), 1768 (vw), 1760 (vw) 1668 (s, as- CO_2^-), 1514 (w, C=N) cm^{-1} .

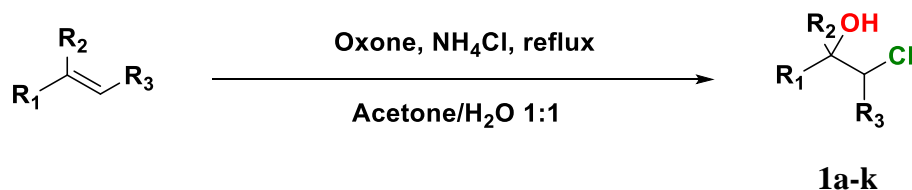
MS (ESI-TOF, DMSO) m/z (%) : 406,91 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Analyse élémentaire (%) pour $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClN}_4\text{O}_4$

Théorique : C 31,30 ; H 1,84 ; N 14,60.

Expérimentale : C 31,21 ; H 1,81 ; N 14,51.

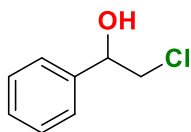
3-1-2. Synthèse des chlorhydrines de référence



N°	R ₁	R ₂	R ₃
1a	Ph	H	H
1b	Ph	H	CH ₃
1c	Ph	CH ₃	H
1d	4-méthoxyphényle	H	H
1^e	4-bromophényle	H	H
1f	H		
1g	H		
1h	Ph	H	Ph
1i	2-bromophényle	H	H
1j	CH ₃	-(CH ₂) ₄ -	
1k	H	-(CH ₂) ₆ -	

*Procédure générale*²⁰⁴

L'alcène (1 mmol ; 1 éq.) est dilué dans 10 mL d'un mélange acétone/H₂O 1/1 sous agitation. Ensuite, 118 mg de NH₄Cl (2,2 mmol ; 2,2 éq.) et 669 mg d'Oxone® (2,2 mmol ; 2,2 éq.) sont ajoutés en même temps. Le mélange réactionnel est ensuite mis à reflux jusqu'à la disparition totale de l'alcène et l'avancement de la réaction est suivi par CCM (éluant : *n*-hexane-AcOEt). La phase organique est séparée et la phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt (2 x 15 mL). Les différentes phases organiques sont ensuite combinées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est purifié sur colonne de silice utilisant un mélange *n*-hexane-AcOEt comme éluant pour donner le produit **1**.

2-chloro-1-phényléthanol (1a)

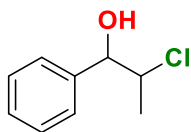
Rendement : 95 %.

Solvant de purification : Hexane/AcOEt 9/1.

Caractérisé selon la référence.²⁰⁴

GC : programme A (t.r. = 11,34 min).

HPLC : programme 5 (t.r. = 12,1 et 13,6 min).

2-chloro-1-phénylpropanol (1b)

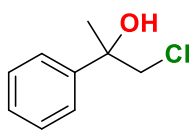
Rendement : 97 %.

Solvant de purification : Hexane/AcOEt 9/1.

Caractérisé selon la référence.²⁰⁴

GC : programme A (t.r. = 11,69 min).

HPLC : programme 5 (t.r. = 9,2 ; 9,7 ; 10,3 ; 11,0 min).

1-chloro-2-phénylpropan-2-ol (1c)

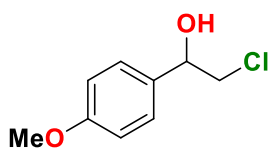
Rendement : 92 %.

Solvant de purification : Hexane/AcOEt 9/1.

Caractérisé selon la référence.²⁰⁴

GC : programme A (t.r. = 11,81 min).

HPLC : programme 5 (t.r. = 9,7 et 10,6 min).

2-chloro-1-(4-méthoxyphényl)éthanol (1d)

Rendement : 98 %.

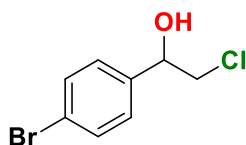
Solvant de purification : Hexane/AcOEt 8/2.

Caractérisé selon la référence.²⁰⁴

GC : programme A (t.r. = 14,0 min).

HPLC : programme 7 (t.r. = 12,4 et 13,6 min).

1-(4-bromophényl)-2-chloroéthanol (1e)



Rendement : 83 %.

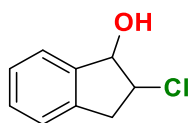
Solvant de purification : Hexane/AcOEt 9/1.

Caractérisé selon la référence.²⁰⁴

GC : programme A (t.r. = 15,03 min).

HPLC : programme 5 (t.r. = 11,0 et 12,3 min).

2-chloro-2,3-dihydro-1H-indénol (1f)



Rendement : 88 %.

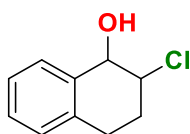
Solvant de purification : Hexane/AcOEt 9/1.

Caractérisé selon la référence.²⁰⁴

GC : programme A (t.r. = 12,88 et 13,03 min).

HPLC : programme 5 (t.r. = 10,8 et 11,5 min).

2-chloro-1,2,3,4-tétrahydronaphthalénol (1g)



Rendement : 85 %.

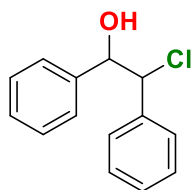
Solvant de purification : Hexane/AcOEt 9/1.

Caractérisé selon la référence.²⁰⁴

GC : programme A (t.r. = 15,11 min).

HPLC : programme 5 (t.r. = 11,0 et 12,6 min).

2-chloro-1,2-diphényléthanol (1h)

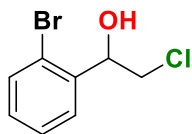


Rendement : 73 %.

Solvant de purification : Hexane/AcOEt 9/1.

Caractérisé selon la référence.²⁰⁴

GC : programme B (t.r. = 10,85 min).

1-(2-bromophényl)-2-chloroéthanol (1i)

Rendement : 81 %.

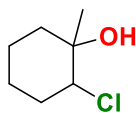
Solvant de purification : Hexane/AcOEt 9/1.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 7,59-7,23 (m, 5H), 5,24 (dd, J = 8,6 Hz, J = 2,7 Hz, 1H), 3,88 (dd, J = 11,3 Hz, J = 2,8 Hz, 1H), 3,51 (dd, J = 11,3 Hz, J = 8,7 Hz, 1H).

MS : m/z = 233.

GC : programme A (t.r. = 14,65 min).

HPLC : programme 1 (t.r. = 11,7 et 12,1 min).

2-chloro-1-méthylcyclohexanol (1j)

Rendement : 56 %.

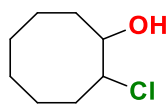
Solvant de purification : Hexane/AcOEt 9/1.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 3,5-3,45 (m, 1H), 1,75-1,58 (m, 4H), 1,35-1,27 (m, 4H), 1,18 (s, 3H).

MS : m/z = 148.

GC : programme A (t.r. = 8,72 min).

HPLC : -

2-chlorocyclooctan-1-ol (1k)

Rendement : 66 %.

Solvant de purification : Hexane/AcOEt 9/1.

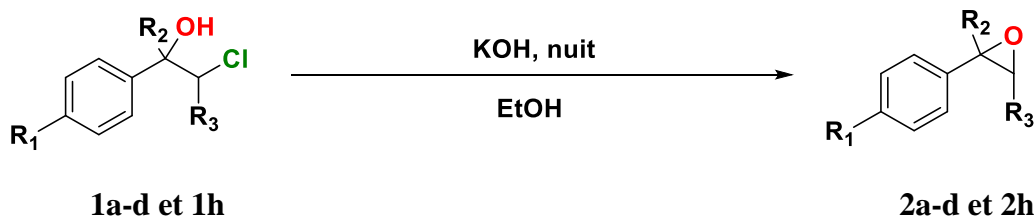
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 4,20-4,16 (m, 1H), 3,84-3,82 (m, 1H), 2,18-1,97 (m, 4H), 1,88-1,73 (m, 6H), 1,53-1,27 (m, 2H).

Masse : m/z = 162.

GC : programme A (t.r. = 12,72 min).

HPLC : -

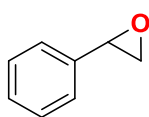
3-1-3. Synthèse des époxydes de référence



N°	R ₁	R ₂	R ₃
2a	H	H	H
2b	H	H	CH ₃
2c	H	CH ₃	H
2d	4MeO	H	H
2h	H	H	Ph

Procédure générale

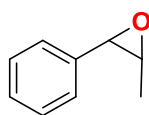
La chlorhydrine **1** (1,16 mmol ; 1 éq.) est diluée dans 20 mL d'EtOH avant l'ajout de 72 mg de KOH (1,28 mmol ; 1,1 éq.). Le milieu réactionnel est ensuite agité à température ambiante toute la nuit. A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est dilué avec 20 mL d'H₂O puis est extrait deux fois avec du DCM. Les phases organiques sont ensuite séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Aucune étape de purification n'est nécessaire sur cette réactivité.

2-phényloxirane (2a)

Produit commercial.

GC : programme A (t.r. = 8,79 min).

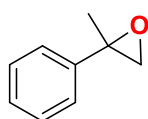
HPLC : programme 6 (t.r. = 23,4 et 24,8 min).

2-méthyl-3-phényloxirane (2b)

Produit commercial.

GC : programme A (t.r. = 9,05 min).

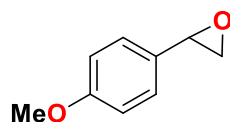
HPLC : programme 5 (t.r. = 21,4 et 23,1 min).

2-méthyl-2-phényloxirane (2c)

Caractérisé selon la référence.²³³

GC : programme A (t.r. = 9,21 min).

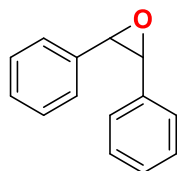
HPLC : programme 5 (t.r. = 24,1 et 25,8 min).

2-chloro-1-(4-méthoxyphényl)éthanol (2d)

Caractérisé selon la référence.²³³

GC : programme A (t.r. = 11,8 min).

HPLC : programme 6 (t.r. = 27,9 et 30,2 min).

2-chloro-1-(4-méthoxyphényl)éthanol (2h)

Produit commercial.

GC : programme A (t.r. = 11,8 min).

HPLC : programme 6 (t.r. = 27,9 et 30,2 min).

3-1-4. Synthèse du complexe Mg(EDTA)

5,9 mg de chlorure de magnésium hexahydrate (0,062 mmol ; 1 éq.) sont dissous dans 50 mL d'H₂O. Ensuite, 23,1 mg de sel sodique dihydraté de l'EDTA (0,062 mmol ; 1 éq.) sont dissous dans 100 mL d'H₂O puis additionnés au milieu réactionnel. Ensuite, sont ajoutés 13,1 mg de Na₂CO₃ (0,124 mol ; 2 éq.) pour neutraliser les protons relargués. La solution est ajustée à pH 7 avec HCl à 1 M puis chauffée à reflux pendant une nuit. De l'EtOH est ajouté jusqu'à l'apparition d'un trouble. Finalement, la solution est refroidie dans un bain de glace et une poudre blanche est obtenue. La poudre est ensuite recristallisée avec un mélange H₂O/EtOH 1/1 et séchée sous vide pendant 72 h.

Rendement : 75 %.

MS (ESI-TOF, DMSO) m/z (%) : 113 [Mg²⁺(EDTA)-3H]⁻.

3-2. Préparation, purification et caractérisation des hybrides

3-2-1. Préparation et purification de l'hybride NikA/Ru-bpza

2,6 mg de complexe **Ru(bpza)(CO)₂Cl** (15 éq.) sont incubés avec 10 mL de protéine NikA à 50 µM, en solution dans du tampon Tris-HCl 40 mM pH 7,5, pendant une nuit à 4°C sous agitation douce. Après l'incubation, l'excès de complexe est éliminé sur colonne de dessalage NAP10. La solution contenant l'hybride **NikA/Ru(bpza)** est ensuite concentrée par centrifugation sur membrane Vivaspinn possédant un seuil de coupure de 30 kDa pour obtenir une concentration finale d'hybride située entre 400 et 800 µM.

3-2-2. Caractérisation de l'hybride NikA/Ru(bpza)

Dosage de la protéine NikA :

Une gamme étalon est réalisée avec la BSA à 2 mg.mL⁻¹. Différents échantillons de BSA sont préparés (0, 5, 10, 20, 40 et 60 µL) et leur volume est ajusté à 2 mL avec du tampon KH₂PO₄ à 10 mM pH 6,8. Ensuite, 100 µL d'une solution de Rose Bengale à 1 mg.mL⁻¹ sont ajoutés à chaque échantillon, incubé à température ambiante pendant 5 min. Après l'incubation, 100 µL d'acide acétique glacial à 50 % sont ajoutés à chaque échantillon. Ils sont ensuite agités au vortex et l'absorbance est lue à 560 nm. Après l'obtention de la gamme étalon, la concentration en protéine de la solution d'hybride **NikA/Ru(bpza)** peut être déterminée par comparaison en réalisant le même dosage colorimétrique au Rose Bengale.

Dosage du ruthénium :

La concentration en ruthénium de l'hybride **NikA/Ru(bpza)** est mesurée par ICP-AES. La courbe d'étalonnage est réalisée avec des échantillons commerciaux de ruthénium et d'ytterbium (référence). Pour le ruthénium, une solution mère est préparée de 1 mg.mL⁻¹ dans un volume final de 10 mL. Pour l'ytterbium, une solution à 80 µg.L⁻¹ dans un volume final de 25 mL est préparée. Pour les différents échantillons de la gamme étalon, sont ajoutés un volume de solution de ruthénium à 1 g.mL⁻¹ compris entre 0 et 50 µL, 9 mL d'HNO₃ 1 % et 1 mL de solution d'ytterbium à 80 µg.L⁻¹. Pour la solution d'hybride à tester, les échantillons doivent être préalablement minéralisés dans HNO₃ à 10 %, sous agitation pendant une nuit. Ils sont ensuite dilués au 10^{ème} puis centrifugés avant injection.

Ratio ruthénium/protéine : 0,97 ±0.05.

Détermination de la structure de l'hybride NikA/Ru(bpza)

Des cristaux orthorhombiques de **NikA/Fe-EDTA** sont incubés avec 5 μL d'une solution de complexe de **Ru(bpza)** à 5 mM dans le tampon A pendant 8 h. 2 μL de la solution de **Ru(bpza)** sont alors ajoutés, deux fois, toutes les 12 h. Les cristaux sont ensuite cryo-protégés avec une solution de glycérol à 25 % (v/v), dans le tampon A, et congelés à l'azote liquide. Les cristaux sont ensuite analysés au synchrotron et la structure est déterminée selon le protocole standard (PDB code : 5L8D).

Spectroscopie infra-rouge

Une goutte d'hybride **NikA/Ru(bpza)** à 4 mM dans le tampon HEPES 10 mM pH 7,5 est déposée sur un appareil IR-ATR. Ensuite, 1 500 scans sont enregistrés utilisant le tampon HEPES 10 mM pH 7,5 comme blanc.

IR complexe **Ru(bpza)** : $\nu(\text{CO})_1$: 2076 cm^{-1} , $\nu(\text{CO})_2$: 2005 cm^{-1} .

IR hybride **Nika-Ru(bpza)** : $\nu(\text{CO})_1$: 2082 cm^{-1} , $\nu(\text{CO})_2$: 2017 cm^{-1} , $\nu(\text{CO})_3$: 2005 cm^{-1} .

Spectrométrie de masse native

80 μL d'une solution d'hybride **NikA/Ru(bpza)** à 300 mM dans le tampon Tris-HCl 40 mM pH 7,5 sont dessalés sur une colonne de chromatographie microBiospin (BIORAD) équilibrée avec 250 mM d'acétate d'ammonium. Les échantillons sont ensuite envoyés à Elisabetta Boeri-Erba de l'IBS et étudiés par spectrométrie de masse native.

Différence Apo vs holo : \approx 385 m/z.

3-3. Procédures catalytiques

3-3-1. Procédure générale pour l'hydroxychloration d'alcènes avec l'hybride NikA/Ru(bpza) purifié

Les catalyses sont réalisées avec un ratio catalyseur/substrat/oxydant/chlorure de 1/500/600/75. La concentration en catalyseur est de 37 μM .

Dans un tube Eppendorf, sont introduits dans l'ordre, 10 μL d'une solution d'hybride **NikA/Ru(bpza)** à 496 μM (5 nmol ; 1 éq.) dans le tampon Tris-HCl 40 mM pH 7,5 (75 éq. en Cl^-), 118 μL de tampon HEPES à 10 mM à pH 7,0 et 6 μL d'une solution d'alcène à 0,41 M (2,46 μmol ; 500 éq.) dilués dans CH_3CN . Ensuite, 1 mg de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ (2,95 μmol ; 600 éq.)

est ajouté. La réaction est agitée à température ambiante pendant 10 minutes. Ensuite, 5 μL d'une solution de benzophénone à 0,1 M diluée dans le DCE (référence interne) sont ajoutés puis le mélange réactionnel est extrait avec 200 μL d'AcOEt. La phase organique est ensuite analysée en GC/MS.

Pour les expériences de cinétique, chaque temps correspond à une réaction de catalyse isolée.

3-3-2. Procédure générale pour l'hydroxychloration d'alcènes avec l'hybride NikA/Ru(bpza) préparé in situ

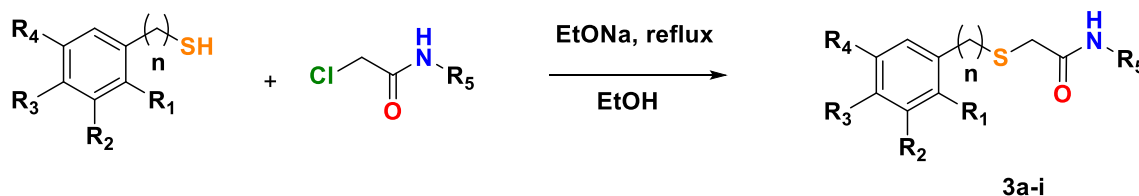
*Les catalyses sont réalisées avec un ratio catalyseur/substrat/oxydant/chlorure de 1/500/600/75. La concentration en catalyseur est de 37 μM . Cette méthodologie a été utilisée avec les complexes **Ru(bpza)**, **Mg(EDTA)** et **Ru(DMSO)₄Cl₂**.*

Dans un tube Eppendorf, 10 μL d'une solution de la protéine NikA à 496 μM (5 nmol ; 1 éq.) dans le tampon Tris-HCl 40 mM pH 7,5 (0,37 μmol ; 75 éq.) sont incubés avec 30 μL d'une solution de complexe **Ru(bpza)** à 800 μM (25 nmol ; 5 éq.) dans le tampon HEPES 10 mM pH 7 pendant 30 min. Ensuite, sont introduits dans l'ordre, 88 μL de tampon HEPES à 10 mM pH 7, 6 μL d'une solution d'alcène à 0,41 M (2,46 μmol ; 500 éq.) dans CH_3CN et 1 mg de $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ (2,95 μmol). La réaction est agitée à température ambiante pendant 10 min. Ensuite, 5 μL d'une solution de benzophénone à 0,1 M diluée dans le DCE (référence interne) sont ajoutés puis le mélange réactionnel est extrait avec 200 μL d'AcOEt. La phase organique est ensuite analysée en GC/MS.

4. Réactivité sulfoxydation par les CLEC

4-1. Synthèse

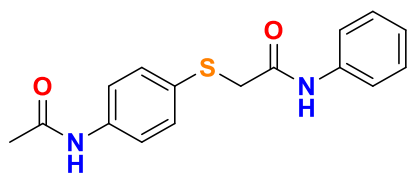
4-1-1. Synthèse des substrats thioéthers



N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	n
3a	H	H	acétamide	H	Ph	0
3b	H	H	CH ₃	H	Ph	0
3c	H	OMe	OMe	H	Ph	0
3d	OMe	H	H	OMe	Ph	0
3e	H	H	H	H	Ph	1
3f	H	H	acétamide	H	Naphtyl	0
3g	H	H	CH ₃	H	Naphtyl	0
3h	OMe	H	H	OMe	Naphtyl	0
3i	H	H	H	H	Naphtyl	1

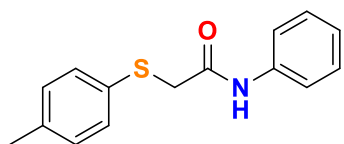
Procédure générale¹¹

Le thiophénol (5,98 mmol ; 1 éq.) est dissous dans 20 mL d'EtOH sous atmosphère inerte. Sous agitation, 814 mg d'EtONa (11,96 mmol ; 2 éq.) sont additionnés en 10 min et un thiolate de couleur marron se forme. Le chloroacétamide (6,58 mmol ; 1,1 éq.) est dissous dans 30 mL d'EtOH. Cette solution est ajoutée goutte à goutte sur le thiolate formé à l'aide d'une ampoule à addition. Le mélange est porté à reflux jusqu'à la disparition totale du thiophénol et l'avancement de la réaction est suivi par CCM (éluant : acétone/CHCl₃ 1/9) (temps de réaction entre 1 h et 16 h). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante et dilué avec 20 mL H₂O puis est extrait avec du DCM. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est ensuite purifié soit sur colonne de gel de silice avec un éluant acétone/CHCl₃ 1/9 soit recristallisé dans le MeOH.

2-((4-Acétamidophényl)thio)-*N*-phénylacétamide (3a)Caractérisé selon la référence.¹¹

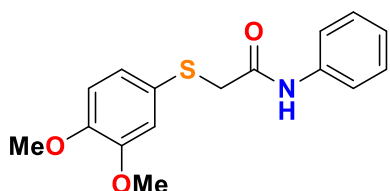
GC : -

HPLC : programme 3 (t.r. = 32,7 min).

N-phényl-2-(*p*-tolylthio)acétamide (3b)Caractérisé selon la référence.¹¹

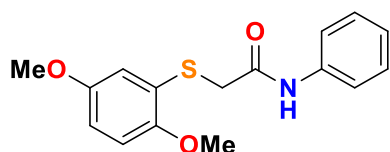
GC : -

HPLC : programme 2 (t.r. = 8,9 min).

2-((3,4-diméthoxyphényl)thio)-*N*-phénylactéamide (3c)Caractérisé selon la référence.¹¹

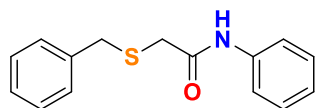
GC : -

HPLC : programme 2 (t.r. = 36,4 min).

2-((2,5-diméthoxyphényl)thio)-*N*-phénylactéamide (3d)Caractérisé selon la référence.¹¹

GC : -

HPLC : programme 2 (t.r. = 24,4 min).

2-(benzylthio)-*N*-phénylacétamide (3e)**Rendement** : 84 %.

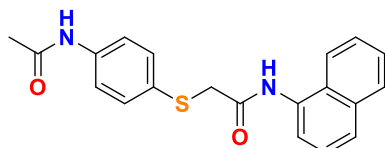
Solide brun pale.

Purification : colonne de gel de silice avec éluant : acétone/CHCl₃ 1/9.**RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz)**, δ : 8,46 (s, 1H), 7,50-7,12 (m, 10H), 3,81 (s, 2H), 3,31 (s, 2H).**RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz)**, δ : 166,5 ; 137,4 ; 136,9 ; 129,0 ; 128,9 ; 127,6 ; 124,6 ; 119,7 ; 37,4 ; 36,4.**MS** : m/z = 257.

GC : -

HPLC : programme 2 (t.r. = 10,1 min).

2-((4-acétamidophényl)thio)-N-(naphtalène-2-yl)acétamide (3f)



Rendement : 74 %.

Solide blanc.

Purification : colonne de gel de silice avec éluant : acétone/ CHCl_3 1/9.

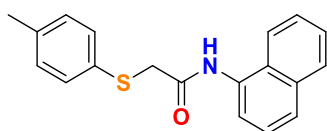
RMN ^1H (MeOD, 300 MHz), δ : 7,88 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,78 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,64-7,43 (m, 9H), 3,89 (s, 2H), 2,15 (s, 3H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz), δ : 170,6 ; 163,8 ; 142,5 ; 136,1 ; 134,2 ; 132,0 ; 128,1 ; 127,9 ; 126,5 ; 126,0 ; 125,8 ; 125,5 ; 125,0 ; 122,0 ; 121,8 ; 120,0 ; 62,3 ; 29,3 ; 22,6.

MS : $m/z = 350$.

GC : -

HPLC : programme 3 (t.r. = 10,4 min).

N-(naphtalène-2-yl)-2-(*p*-tolylthio)acétamide (3g)

Rendement : 87 %.

Solide blanc.

Purification : recristallisation MeOH.

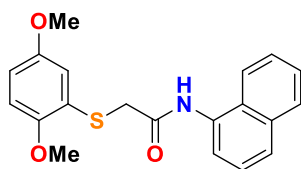
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ : 9,18 (s, 1H), 7,98 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,87 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,71 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,57 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,51-7,36 (m, 6H), 7,19-7,17 (m, 1H), 3,93 (s, 2H), 2,35 (s, 3H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz), δ : 166,4 ; 137,3 ; 134,1 ; 131,9 ; 130,3 ; 128,8 ; 128,7 ; 126,9 ; 126,3 ; 126,0 ; 125,8 ; 125,7 ; 120,3 ; 120,1 ; 36,9 ; 21,0.

MS : $m/z = 307$.

GC : -

HPLC : programme 2 (t.r. = 20,9 min).

2-((2,5-diméthoxyphényl)thio)-*N*-(naphtalène-2-yl)acétamide (3h)

Rendement : 59 %.

Solide blanc.

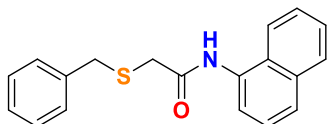
Purification : colonne de gel de silice avec éluant : acétone/ CHCl_3 1/9.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ : 9,43 (s, 1H), 7,98 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,88 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,71 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,49 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H), 7,06 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 6,85 (d, $J = 3,9$ Hz, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,74 (s, 3H).

MS : $m/z = 353$.

GC : -

HPLC : programme 3 (t.r. = 22,9 min).

2-(benzylthio)-*N*-(naphtalène-2-yl)acétamide (3i)

Rendement : 92 %.

Solide violet pâle.

Purification : recristallisation MeOH.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz), δ : 9,21 (s, 1H), 8,05 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,91 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 7,85 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H), 7,72 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,58-7,78 (m, 3H), 7,37-7,24 (m, 5H), 3,91 (s, 2H), 3,48 (s, 2H).

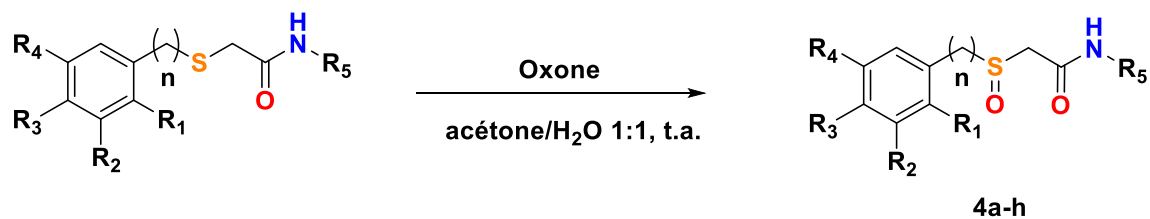
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz), δ : 166,8 ; 136,7 ; 134,1 ; 132,0 ; 129,0 ; 128,9 ; 127,7 ; 126,4 ; 126,0 ; 125,8 ; 125,5 ; 120,2 ; 119,4 ; 37,5 ; 36,6.

MS : $m/z = 307$.

GC : -

HPLC : programme 2 (t.r. = 19,1 min).

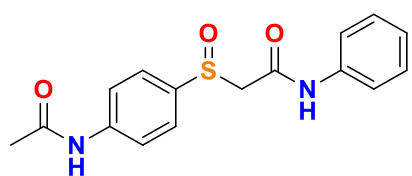
4-1-2. Synthèse des sulfoxydes références



N°	lettre	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	n
4a	a	H	H	acétamide	H	Ph	0
4b	b	H	H	CH ₃	H	Ph	0
4c	c	H	OMe	OMe	H	Ph	0
4d	d	OMe	H	H	OMe	Ph	0
4e	e	H	H	H	H	Ph	1
4f	f	H	H	acétamide	H	Naphtyle	0
4g	g	H	H	CH ₃	H	Naphtyle	0
4h	h	H	H	H	H	Naphtyle	1

Procédure générale

Le thioéther (0,33 mmol ; 1 éq.) est dissous dans 25 mL d'une solution acétone/H₂O 1/1. Sous agitation, 110 mg d'Oxone® (0,36 mmol ; 1,1 éq.) sont ajoutés en 30 min. La réaction est poursuivie à température ambiante jusqu'à disparition totale du thioéther et l'avancement de la réaction est suivi par CCM (éluant : acétone/CHCl₃ 1/9) (temps de réaction entre 10 min et 2 h). Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec un grand volume d'H₂O (40 mL) puis est extrait avec du DCM. Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est ensuite soit purifié sur colonne de gel de silice en utilisant un mélange acétone/CHCl₃ 1/9 comme éluant pour donner le produit sulfoxyde désiré pur soit recristallisé au MeOH.

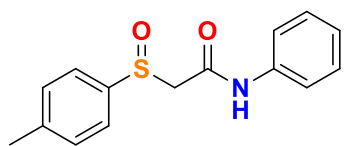
2-((4-acétamidophényl)sulfinyl)-N-phénylacétamide (4a)

Caractérisé selon la référence.¹¹

HPLC : programme 3 (t.r. = 43,6 min et 47,5 min).

GC : -

N-phényl-2-(p-tolylsulfinyl)acétamide (4b)

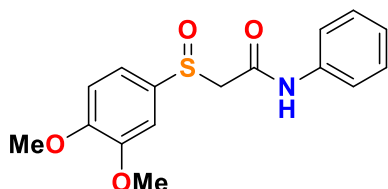


Caractérisé selon la référence.¹¹

HPLC : programme 2 (t.r. = 12,2 et 12,9 min).

GC : -

2-((3,4-diméthoxyphényl)sulfinyl)-N-phénylactéamide (4c)

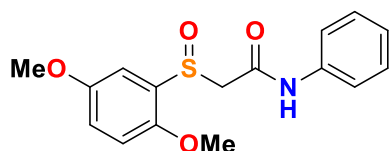


Caractérisé selon la référence.¹¹

HPLC : programme 2 (t.r. = 19,7 et 22,4 min).

GC : -

2-((2,5-diméthoxyphényl)thio)-N-phénylactéamide (4d)

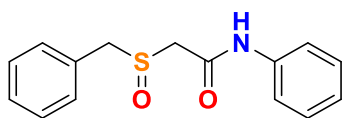


Caractérisé selon la référence.¹¹

HPLC : programme 2 (t.r. = 18,8 et 19,8 min).

GC : -

2-(benzylsulfinyl)-N-phénylactéamide (4e)



Rendement : 92 %.

Solide blanc.

Purification : recristallisation MeOH.

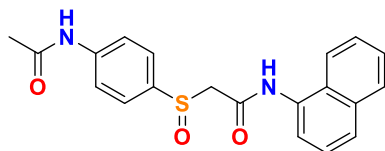
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 9,00 (s, 1H), 7,59 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,42-7,28 (m, 7H), 7,17 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 4,22 (s, 1H), 3,75 (AB, J = 14,7 Hz, 1H), 3,29 (AB, J = 14,7 Hz, 1H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 162,1 ; 137,5 ; 130,4 ; 129,2 ; 129,0 ; 128,9 ; 128,5 ; 124,8 ; 120,3 ; 57,4 ; 51,7.

MS : m/z = 273.

GC : -

HPLC : programme 2 (t.r. = 12,1 et 13,7 min).

2-((4-acétamidophényl)sulfinyl)-*N*-(naphtalène-2-yl)acétamide (4f)

Rendement : 86 %.

Solide blanc.

Purification : recristallisation MeOH.

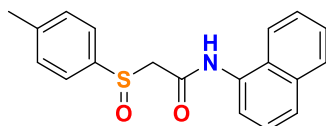
RMN ¹H (MeOD, 300 MHz), δ : 7,90-7,76 (m, 7H), 7,58-7,43 (m, 4H), 4,25 (AB, $J = 13,0$ Hz, 1H), 4,12 (AB, $J = 13,0$ Hz, 1H), 2,17 (s, 3H).

RMN ¹³C (MeOD, 75 MHz), δ : 170,6 ; 163,8 ; 142,5 ; 136,1 ; 134,2 ; 132,0 ; 127,9 ; 126,5 ; 126,0 ; 125,8 ; 125,5 ; 125,0 ; 122,2 ; 121,8 ; 120,0 ; 62,3 ; 25,6.

MS : $m/z = 366$.

GC : -

HPLC : programme 3 (t.r. = 43,9 et 55,1 min).

N-(naphtalène-2-yl)-2-(*p*-tolylsulfinyl)acétamide (4g)

Rendement : 78 %.

Solide blanc.

Purification : recristallisation MeOH.

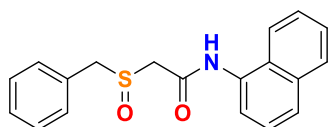
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 9,56 (s, 1H), 8,15 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,99 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,87 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,68 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,58-7,54 (m, 4H), 7,43 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,28 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 4,07 (AB, $J = 14,5$ Hz, 1H), 3,69 (AB, $J = 14,5$ Hz, 1H), 2,38 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 163,9 ; 161,0 ; 142,8 ; 138,9 ; 134,2 ; 132,0 ; 130,0 ; 128,1 ; 127,9 ; 126,4 ; 125,9 ; 125,8 ; 125,0 ; 124,4 ; 122,1 ; 121,9 ; 62,2 ; 20,1.

MS : $m/z = 323$.

GC : -

HPLC : programme 2 (t.r. = 38,9 et 42,2 min).

2-(benzylsulfinyl)-*N*-(naphtalène-1-yl)acétamide (4h)

Rendement : 91 %.

Solide blanc.

Purification : recristallisation MeOH.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 9,60 (s, 1H), 8,18 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 8,08 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,88 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,71 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,55-7,48 (m, 3H), 7,48-7,28 (m, 5H), 4,28 (AB, J = 12,9 Hz, 1H), 4,22 (AB, J = 12,9 Hz, 1H), 3,88 (AB, J = 14,4 Hz, 1H), 3,49 (AB, J = 14,4 Hz, 1H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 162,8 ; 134,1 ; 132,4 ; 130,4 ; 129,3 ; 128,9 ; 128,6 ; 128,5 ; 126,6 ; 126,3 ; 126,1 ; 125,7 ; 125,6 ; 121,1 ; 119,7 ; 57,4 ; 51,2.

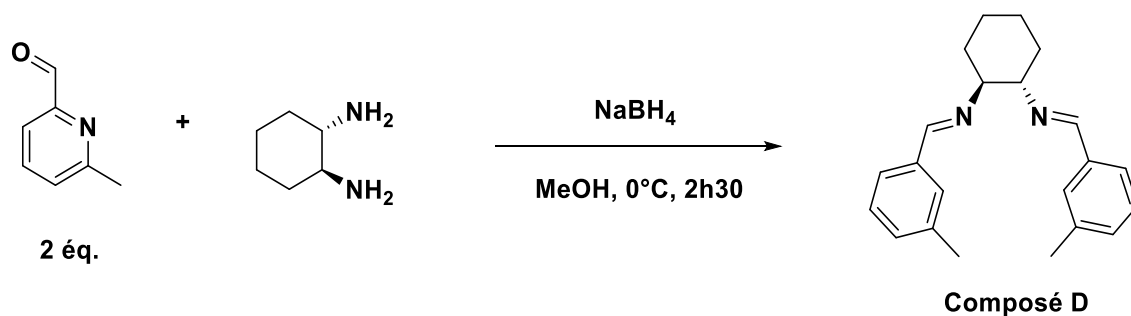
Masse : m/z = 323.

GC : -

HPLC : programme 2 (t.r. = 33,5 et 35,8 min).

4-1-3. Synthèse du ligand N₂Py₂

Etape 1

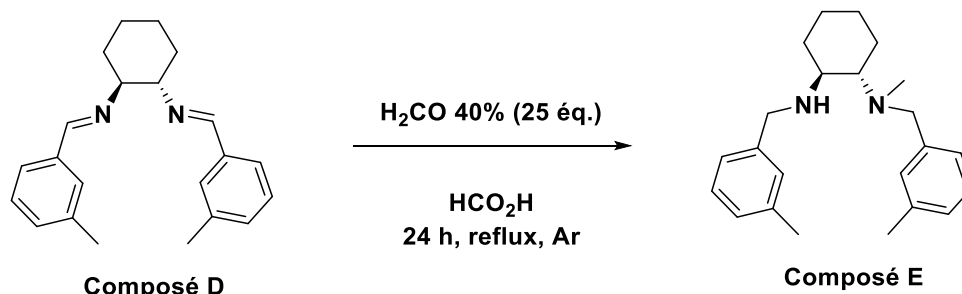


1,5 g de 6-méthylpyridine-2-carboxaldéhyde (12,4 mmol ; 2 équ.) sont dissous dans 15 mL de MeOH et refroidis à 0°C. Puis, 0,744 mL de (*1S2S*)-1,2-diaminocyclohexane (708 mg ; 6,2 mmol ; 1 équ.) dilués dans 15 mL de MeOH, sont ajoutés goutte à goutte en 2 h à l'aide d'une ampoule à brome. Le milieu réactionnel est agité sous argon à température ambiante pendant 2 h. Du Na₂SO₄ est ajouté et le mélange est agité une heure supplémentaire, puis filtré. Ensuite, 0,961 g de NaBH₄ (25,4 mmol ; 4,1 équ.) est additionné lentement à la solution précédente en maintenant la température inférieure à 5°C (la solution devient incolore). Le milieu réactionnel est ensuite agité à reflux pendant 30 min. Après refroidissement à

température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec 10 mL d'H₂O avant d'être extrait avec du DCM. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est ensuite purifié sur colonne de gel de silice avec un éluant DCM/MeOH/NEt₃ 96/4/1 afin d'obtenir le **composé D** sous forme d'une huile jaunâtre avec un rendement de 85% (1,71 g).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ : 7,44 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,14 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 6,92 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 3,98 (AB, J = 14,2 Hz, 2H), 3,76 (AB, J = 14,2 Hz, 2H), 2,42 (s, 6H), 2,08 (d, J = 10,6 Hz, 2H), 1,66 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 1,18-1,10 (m, 6H).

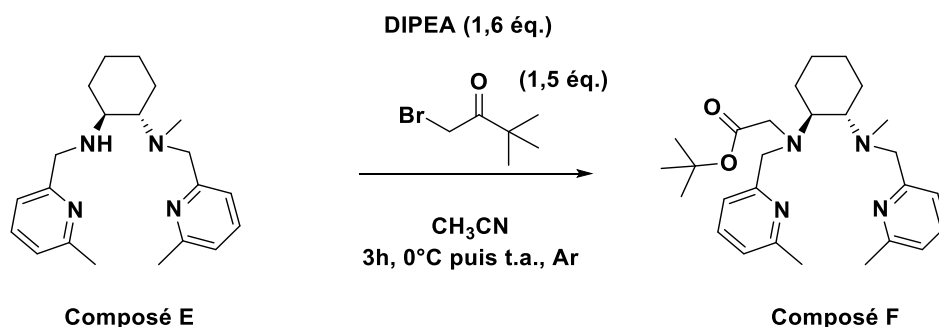
Etape 2



Le **composé D** (1,71 g ; 5,27 mmol ; 1 \u00e9q.) est dilu\u00e9 dans 55 mL d'acide formique avant l'ajout de 4,83 mL de formald\u00e9hyde (3,93 g ; 131,2 mmol ; 25 \u00e9q.). Apr\u00e8s 24 h de r\u00e9action \u00e0 reflux et sous argon, le milieu r\u00e9actionnel est dilu\u00e9 avec 10 mL d'H₂O, puis 30 mL d'une solution de NaOH \u00e0 5N sont ajout\u00e9s \u00e0 0\u00b0C. La solution est ensuite extraite avec du DCM et les phases organiques sont s\u00e9ch\u00e9es sur Na₂SO₄, filtr\u00e9es et le solvant est \u00e9vapor\u00e9 sous pression r\u00e9duite afin de donner une huile jaun\u00e2tre. Le produit est purifi\u00e9 sur colonne de gel de silice avec comme \u00e9luant : DCM/MeOH/NEt₃ 96/4/1 afin d'obtenir le **compos\u00e9 E** avec un rendement de 66 % (1,17 g ; 3,45 mmol).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ : 7,46 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,40 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,36 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,00 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,90 (dd, J = 7,7 Hz, J = 2,2 Hz, 2H), 4,09 (sl, 1H), 3,93 (AB, J = 14 Hz, 1H), 3,71 (AB, J = 14 Hz, 1H), 3,70 (AB, J = 14,6 Hz, 1H), 3,52 (AB, J = 14,6 Hz, 1H), 2,40 (s, 6H), 2,21 (s, 3H), 2,13-2,09 (m, 2H), 1,86-1,63 (m, 4H), 1,20-1,03 (m, 4H).

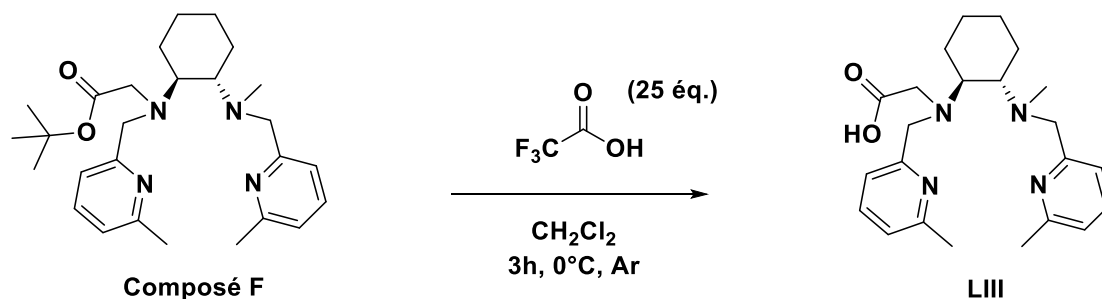
Etape 3



Le **composé E** (500 mg ; 1,47 mmol) est dissous dans 10 mL de CH_3CN en présence de K_2CO_3 (325 mg ; 2,35 mmol ; 1,6 éq.) à 0°C. Ensuite, sont additionnés 327 μL d'acétate de 2-bromo-*tert*-butyle (431 mg ; 2,21 mmol ; 1,5 éq.) dilués dans 10 mL de CH_3CN goutte à goutte au milieu réactionnel. Le mélange est agité pendant 3 h sous argon à température ambiante. Ensuite, le milieu est dilué avec 10 mL d' H_2O et la solution est extraite avec du DCM. Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite afin d'obtenir une huile brune. Celle-ci est purifiée sur colonne de gel de silice avec comme éluant : DCM/MeOH/ NEt_3 96/4/1 afin d'obtenir le **composé F** sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 95 % (632 mg ; 1,40 mmol).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3), δ : 7,51-7,39 (m, 4H), 6,95 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H), 4,05 (AB, $J = 15,3$ Hz, 1H), 3,85 (AB, $J = 15,3$ Hz, 1H), 3,45 (AB, $J = 16,5$ Hz, 1H), 3,31 (AB, $J = 16,5$ Hz, 1H), 2,46 (s, 6H), 2,21 (s, 3H), 2,24-2,20 (m, 2H), 2,11-1,92 (m, 4H), 1,40 (s, 9H), 1,30-1,16 (m, 4H).

Etape 4

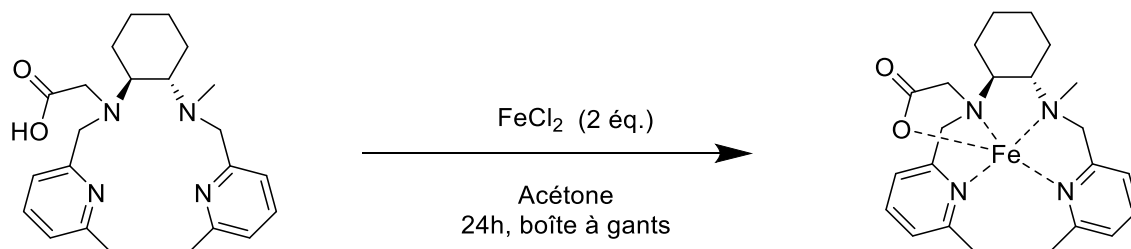


Le **composé F** (400 mg ; 0,865 mmol) est dissous dans 1,3 mL de DCM puis 1,3 mL d'acide trifluoroacétique (1,97 mg ; 17,3 mmol ; 20 éq.) sont additionnés goutte à goutte à 0°C. Le milieu réactionnel est ensuite agité pendant 30 min à 0°C puis à température ambiante

pendant 15 h, sous argon. A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite jusqu'au 4/5^{ème} du volume environ, avant d'être ajouté goutte à goutte à 25 mL Et₂O anhydre sous vive agitation. Le surnageant d'Et₂O est enlevé et le résidu huileux est lavé de nouveau avec de l'Et₂O. Après séchage sous pression réduite, le ligand LIII est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 60 % (200 mg ; 0,502 mmol).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ : 8,16 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,93 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,74 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,29 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 4,32 (s, 2H), 3,68-3,63 (m, 2H), 3,33 (sl, 2H), 2,75 (s, 3H), 2,66 (s, 3H), 2,51 (s, 3H), 2,22 (sl, 1H), 1,96 (sl, 1H), 1,82 (sl, 2H), 1,60 (sl, 2H), 1,38 (sl, 4H).

4-1-4. Synthèse du complexe Fe-LIII



Le complexe de Fe(II) a été synthétisé en boîte à gants sous atmosphère inerte de diazote avec l'utilisation de solvants distillés et dégazés avec de l'argon.

Le ligand LIII (39 mg ; 98,3 μmol) est dissous dans 6 mL d'acétone puis 24,9 mg de FeCl₂ (196,6 μmol ; 2 éq.) est additionné petit à petit afin de former un précipité jaunâtre. La solution est laissée sous agitation pendant 24 h. Un solide jaune pâle est filtré et séché pour donner un rendement de de 91 % (43,5 mg ; 89,4 μmol).

MS (ESI, CH₃CN) : m/z = 451 (100, [L-H + Fe^{II}]⁺) ; 486 (18, [L-H + Cl + Fe^{III}]⁺).

UV-visible (CH₃CN/H₂O 1/1) : λ_{max} = 264 nm et ε = 11 785 L.mol⁻¹.cm⁻¹.

4-2. Préparation des CLEC NikA/Fe-N₂Py₂

L'incubation du complexe de **Fe-LIII** avec les cristaux de **NikA/Fe-EDTA** est réalisée en boîte à gants. Un lot de 100 cristaux de **NikA/Fe-EDTA** est dispatché dans 5 gouttes de 4 μL de tampon de cristallisation. Ensuite, sont ajoutés à chacune des gouttes, 2,5 μL d'une

solution de complexe de **Fe-LIII** à 10 mM dans du tampon A. L'incubation est réalisée pendant 4 jours à 20°C. Les cristaux **NikA/Fe-LIII** sont ensuite pêchés avec une épuisette (hors boîte à gants) et transvasés dans quatre nouvelles gouttes de 5 µL de tampon de cristallisation. Les cristaux sont ensuite réticulés par ajout de 5 µL d'une solution de glutaraldéhyde à 10 % dans du tampon A (concentration finale de glutaraldéhyde : 5 %). On laisse réagir 5 h. Ensuite, les 100 **CLEC NikA/Fe-LIII** sont transférés dans un Eppendorf de 1,5 mL contenant 1 mL d'une solution de CH₃CN/H₂O 1/1 puis lavés deux fois avec 1 mL d'une solution de CH₃CN/H₂O 1/1. Ces cristaux peuvent être stockés plusieurs jours à température ambiante ou être directement utilisés dans les expériences de catalyse.

Pour les études cristallographiques, les **CLEC NikA/Fe-LIII** sont transférés dans une solution H₂O/glycérol 70/30 avant d'être congelés dans l'azote liquide.

4-3. Procédure générale de sulfoxydation des thioéthers avec les CLEC NikA/Fe-N₂Py₂

Les catalyses sont réalisées avec un ratio catalyseur/substrat/NaOCl de 1/250/600. La concentration en catalyseur est de 15 ou 31 µM.

On utilise un lot de 100 **CLEC NikA/Fe-LIII** (1 éq.). Le surnageant est enlevé afin d'obtenir un volume final de 36 µL. Ensuite, sont ajoutés successivement 1,5 µL d'une solution de thioéther à 0,19 M (0,285 µmol ; 250 éq.) dans le DMF et 1,8 µL d'une solution de NaOCl à 0,42 M (756 µmol ; 600 éq.) dans H₂O. La réaction est agitée à température ambiante pendant 1 h. Le milieu réactionnel est ensuite extrait avec 60 µL d'AcOEt. La phase organique est analysée par HPLC.

Pour les expériences de cinétique, chaque point correspond à une expérience de catalyse isolée.

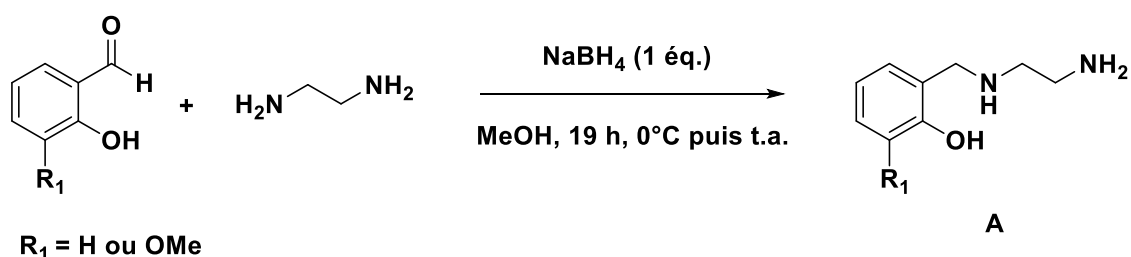
5. Réactivité d'hydroxychloration par les CLEC

5-1. Synthèse

Concernant la synthèse des chlorhydrines de référence, voir partie 1.

5-1-1. Synthèse des ligands L1 et L2²³⁴

Etape 1



58,9 g d'éthylène diamine (980 mmol ; 10 éq.) sont dilués dans 450 mL de MeOH sous agitation. Ensuite, 98 mmol (1 éq.) d'aldéhyde dilué dans 50 mL de MeOH sont ajoutées goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 h à 0°C. Ensuite, 3,71 g de NaBH₄ (98 mmol ; 1 éq.) sont ajoutés progressivement sans dépasser 5°C. La réaction est poursuivie sous agitation à température ambiante pendant 19 h et le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile jaune obtenue est diluée dans 300 mL de DCM puis lavée 4 fois avec une solution de NaCl saturée pour éliminer l'éthylène diamine en excès. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et le solvant est évaporé pour obtenir le composé A.

Caractéristiques de A si R₁ = H :

R% = 80 %.

Huile jaune.

RMN ¹H (300 MHz, MeOD), δ : 7,10 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 6,76 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 3,88 (s, 2H), 2,78 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 2,67 (t, J = 5,7 Hz, 2H).

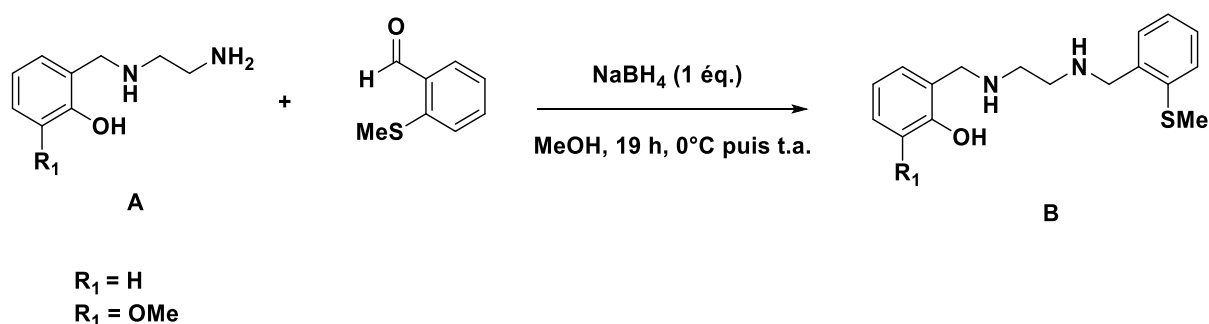
Caractéristiques de A si R₁ = OMe :

R% = 75 %.

Huile jaune.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ : 8,32 (s, 1H), 6,86 (dd, J = 10,8 Hz, J = 1,65 Hz, 1H), 6,84 (dd, J = 10,9 Hz, J = 1,63 Hz, 1H), 6,74 (t, J = 7,80 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,62 (t, J = 5,4 Hz, 2H), 2,96 (t, J = 5,7 Hz, 2H).

Etape 2



Une solution de thiométhylbenzaldéhyde (14,9 g ; 98 mmol ; 1 éq.) dissous dans 150 mL de MeOH est ajoutée au goutte à goutte au composé **A** (98 mmol ; 1 éq.) dilué dans 150 mL de MeOH. La réaction est agitée pendant 1 h à 0°C puis 3,71 g (98 mmol, 1 éq.) de NaBH₄ sont ajoutés progressivement sans dépasser 5°C. La réaction est agitée à température ambiante pendant 19 h. Ensuite, 100 mL de DCM sont ajoutés et la phase organique est lavée 2 fois avec une solution de NaCl saturée. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée et le solvant est évaporé pour obtenir le composé **B**.

Caractéristiques de B si R₁ = H :

R% = 97 %.

Huile jaune.

RMN ¹H (300 MHz, MeOD), δ : 7,34-6,73 (m, 8H), 3,90 (s, 2H), 3,84 (s, 2H), 2,77 (s, 4H), 2,48 (s, 3H).

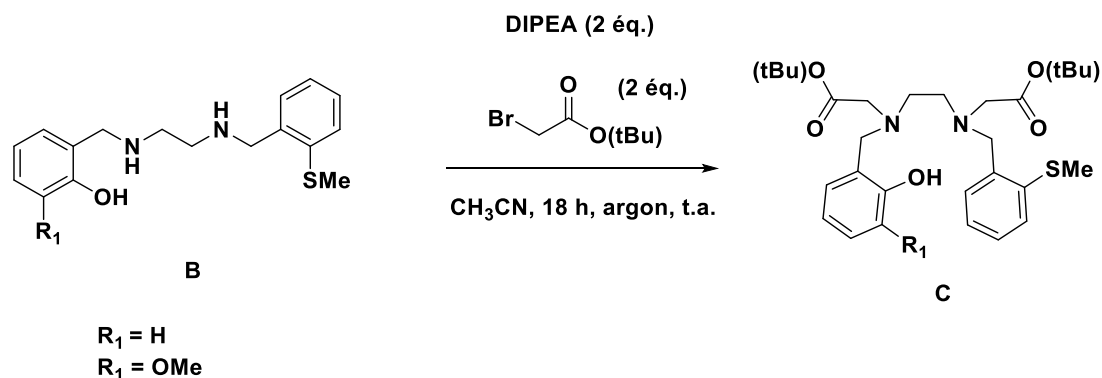
Caractéristiques de B si R₁ = OMe :

R% = 95 %.

Huile jaune.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ : 7,29-7,11 (m, 4H), 6,82-6,63 (m, 3H), 3,99 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 3,87 (s, 2H), 3,90 (s, 2H), 2,82 (t, J = 3,6 Hz, 2H), 2,75 (t, J = 3,9 Hz, 2H), 2,48 (s, 3H).

Etape 3



Le composé **B** (1,76 mmol ; 1 éq.) et 600 μ L de DIPEA (3,52 mmol ; 2 éq.) sont dissous dans 15 mL de CH₃CN. Le milieu réactionnel est placé sous atmosphère inerte et ensuite, une solution de 2-bromoacétate de *tert*-butyle (687 mg ; 3,52 mmol ; 2 éq.) dissous dans 30 mL de CH₃CN est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est ensuite agité pendant 18 h à température ambiante puis dilué avec 100 mL de DCM et lavé avec une solution de NaCl saturée. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut obtenu est purifié sur colonne de gel de silice (Hexane/AcOEt 9/1) afin d'obtenir le composé **C**.

Caractéristiques de C si R₁ = H :

R% = 50 %.

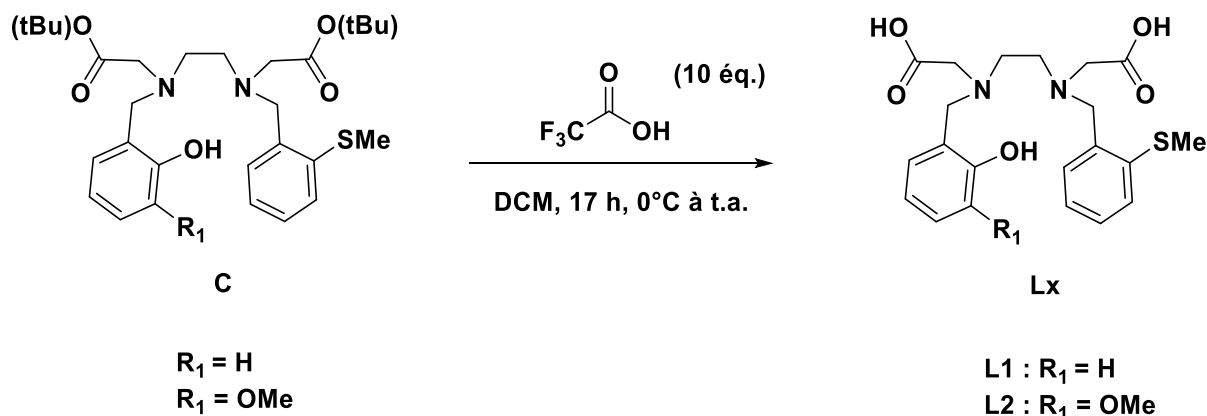
RMN ¹H (300 MHz, MeOD), δ : 7,36-7,07 (m, 5H), 7,39-7,05 (m, 4H), 6,93 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,76 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 3,88 (s, 2H), 3,80 (s, 2H), 3,28 (s, 4H), 2,91 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 2,74 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 2,43 (s, 3H), 1,46 (s, 18H).

Caractéristiques de C si R₁ = OMe :

R% = 53 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ : 7,32 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,21 (m, 2H), 7,08 (m, 1H), 6,81 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,70 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,84 (d, J = 15 Hz, 4H), 3,27 (s, 4H), 2,90 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,75 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,41 (s, 3H), 1,44 (s, 18H).

Etape 4



Le produit **C** (0,67 mmol, 1 éq.) est dissous dans 10 mL de DCM et agité à 0°C. 3,06 g d'acide trifluoroacétique (26,8 mmol ; 40 éq.) sont ajoutés goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité pendant 17 h à température ambiante et le mélange est évaporé au 4/5^{ème}. L'huile résiduelle est versée goutte à goutte à la pipette pasteur (ne pas utiliser d'aiguille métallique) sur 50 mL d'Et₂O agités vigoureusement. Le précipité blanc obtenu est filtré et séché sous pression réduite pour obtenir **Lx**.

Caractéristiques de L1 :

R% = 44 %.

Solide blanc.

RMN ¹H (300 MHz, MeOD), δ : 7,39-7,18 (m, 6H), 6,90 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 4,37 (s, 2H), 3,96 (s, 2H), 3,70 (s, 2H), 3,41 (s, 2H), 3,32 (sl, 2H), 3,17 (sl, 2H), 2,48 (s, 3H).

Caractéristiques de L2 :

R% = 93 %.

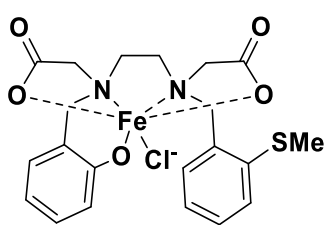
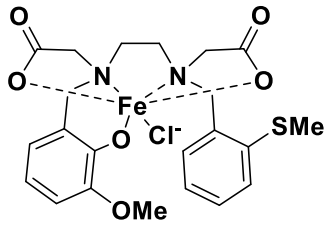
Solide blanc.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ : 9,04 (sl, 2H), 7,29-7,07 (m, 4H), 6,83-6,71 (m, 3H), 4,26 (s, 2H), 3,96 (s, 2H), 3,80 (s, 2H), 3,57 (s, 3H), 3,50 (s, 2H), 3,29 (sl, 2H), 3,19 (sl, 2H), 2,37 (s, 3H).

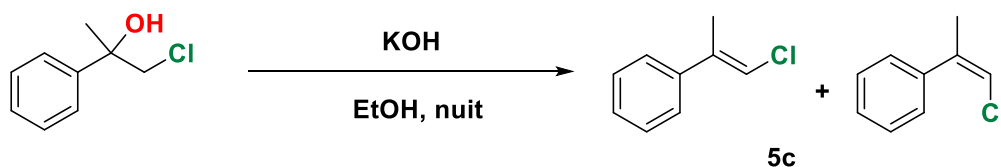
5-1-2. Synthèse des complexes Fe-L1 et Fe-L2²³⁴

Procédure générale

Le ligand **Lx** (0,11 mmol ; 1 éq.) est dissous dans 10 mL d'H₂O avec trois équivalents de KOH (18,5 mg ; 0,33 mmol). Ensuite, 18 mg de FeCl₃ anhydre (0,11 mmol ; 1 éq.) sont dissous dans 3 mL d'H₂O et sont ajoutés goutte à goutte sur la solution de ligand. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante toute la nuit. Le précipité obtenu est filtré, lavé avec 5 mL d'H₂O, 5 mL d'Et₂O et 10 mL de DCM avant d'être séché sous pression réduite.

 <p style="text-align: center;">Fe-L1</p>	<p>R% = 80 %.</p> <p>Solide rouge.</p> <p>MS (ESI, CH₃CN) : m/z : 506 [(L-3H) + Fe(III) + Cl]⁻.</p> <p>UV-visible (CH₃CN/H₂O 1/1) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - λ_{max} = 507 nm. - ε = 745 L.mol⁻¹.cm⁻¹.
 <p style="text-align: center;">Fe-L2</p>	<p>R% = 65 %.</p> <p>Solide violet.</p> <p>MS (ESI, CH₃CN) : m/z : 536 [(L-3H) + Fe(III) + Cl]⁻.</p> <p>UV-visible (CH₃CN/H₂O 1/1) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - λ_{max} = 562 nm. - ε = 1564 L.mol⁻¹.cm⁻¹.

5-1-3. Synthèse du 1-chloro-2-phénylpropène – Produit de la déshydratation du 1-chloro-2-phénylpropan-2-ol.

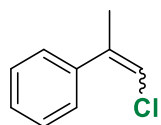


Procédure générale

Le 1-chloro-2-phénylpropan-2-ol (200 mg ; 1,16 mmol ; 1 éq.) est dilué dans 10 mL de CH₃CN avant l'ajout de 70 µL d'H₂SO₄ à 95 % (1,28 mmol ; 1,1 éq.). La réaction est portée à reflux et agitée jusqu'à disparition totale de la chlorhydrine. L'avancement de la réaction est

suivi par CCM (éluant : Hexane/AcOEt 9/1). Après refroidissement à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec 20 mL d'H₂O et extrait avec du DCM. La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est ensuite purifié sur colonne de gel de silice avec un éluant Hexane/AcOEt 9/1.

1-(chloroprop-1-èn-2-yl)benzène (5c)



Rendement : 81 %.

Solvant de purification : Hexane/AcOEt 9/1.

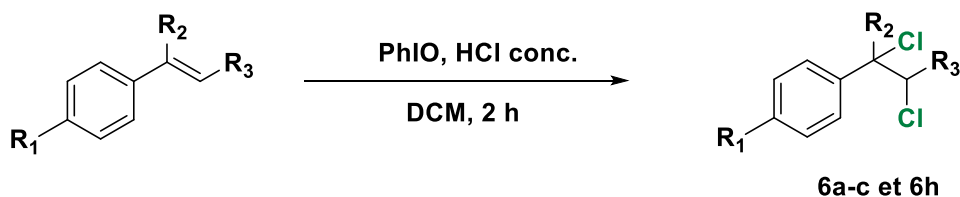
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 7,38-7,34 (m, 5H), 6,34 (s, 1H), 2,17 (s, 3H).

MS : m/z = 152.

GC : programme A (t.r. = 9,80 et 10,41 min).

HPLC : -

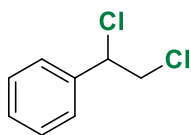
5-1-4. Synthèse des produits dichlorés



N°	lettre	R ₁	R ₂	R ₃	Nom
6	a	Ph	H	H	styrène
6	b	Ph	H	CH ₃	β-méthylstyrène
6	c	Ph	CH ₃	H	α-méthylstyrène
6	h	Ph	H	Ph	Cis-stilbène

Procédure générale

L'alcène (1 mmol ; 1 éq.) est dilué dans 20 mL de DCM sous agitation puis 450 µL d'HCl à 37 % (5 mmol ; 5 éq.) et 264 mg de PhIO (1,2 mmol ; 1,2 éq.) sont ajoutés. La réaction est agitée à température ambiante jusqu'à disparition complète de l'alcène (environ 2 h). L'avancement de la réaction est suivi par CCM (éluant : Pentane/AcOEt 9/1). Ensuite, le milieu réactionnel est dilué avec 20 mL d'H₂O puis est extrait avec du DCM. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut obtenu est purifié sur colonne de gel de silice utilisant un éluant Pentane/AcOEt 9/1 afin d'obtenir le produit désiré.

(1,2-dichloroéthyl)benzène (6a)

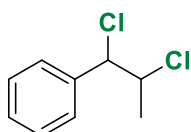
Rendement : 67 %.

Solvant de purification : Pentane/AcOEt 9/1.

Caractérisé selon la référence.²³⁵

GC : programme A : (t.r. = 11,09 min)

HPLC : -

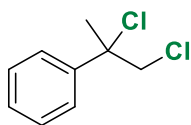
(1,2-dichloropropyl)benzène (6b)

Rendement : 81 %.

Solvant de purification : Pentane/AcOEt 9/1.

Caractérisé selon la référence.²³⁶

GC : programme A : (t.r. = 11,12 min).

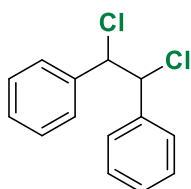
(1,2-dichloropropan-2-yl)benzène (6c)

Rendement : 53 %.

Solvant de purification : Pentane/AcOEt 9/1.

Caractérisé selon la référence.²³⁷

GC : programme A : (t.r. = 11,50 min).

1,2-dichloro-1,2-diphényléthane (6h)

Rendement : 67 %.

Solvant de purification : Pentane/AcOEt 9/1.

Caractérisé selon la référence.²³⁵

GC : programme B : (t.r. = 10,87 et 11,05 min).

5-2. Préparation, purification et caractérisation des CLEC**5-2-1. Purification, cristallisation et synthèse des CLEC NikA/Fe-L_x ou CLEC NikA/Ni-EDTA (x = 0, 1 ou 2)**

Dans une goutte de 4 μL contenant des cristaux de **NikA/Fe-EDTA**, sont ajoutés 2,5 μL d'une solution de complexe (**Fe-L_x** ou **Ni-EDTA**) à 10 mM dans le tampon A. Les cristaux sont incubés une nuit à 20°C. 100 cristaux **NikA/Fe-L_x** ou **NikA/Ni-EDTA** sont ensuite pêchés avec une épuisette et transférés dans une nouvelle goutte de 5 μL de tampon de

crystallisation. Les cristaux sont réticulés par ajout de 5 μL d'une solution de glutaraldéhyde à 10 % dans du tampon A (concentration finale de glutaraldéhyde : 5 %). On laisse réagir 5 h. Ensuite, les 100 **CLEC NikA/Fe-Lx** ou **CLEC NikA/Ni-EDTA** sont transférés dans un Eppendorf de 1,5 mL contenant 1 mL d'une solution de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1 puis lavés deux fois avec 1 mL d'une solution de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1. Ces cristaux peuvent être stockés plusieurs jours à température ambiante ou être directement utilisés dans les expériences de catalyse. Pour les études cristallographiques, les CLEC sont transférés dans une solution H_2O /glycérol 70/30 avant d'être congelés dans l'azote liquide.

5-2-2. Dosage de la protéine NikA dans les cristaux avant réticulation

Le dosage de la protéine NikA dans les cristaux a été réalisé avant réticulation. En effet, les cristaux après réticulation sont indestructibles (hautes températures, acides, bases, etc...) et ne peuvent pas donc être dissous dans H_2O pour déterminer la concentration de la protéine par SEC-MALLS.

La quantité de protéine au sein des cristaux de NikA a été déterminée par SEC-MALLS : 20 cristaux sont solubilisés dans 25 μL H_2O avant l'injection (4 échantillons).

20 cristaux = 252 ± 30 pmol de protéine NikA.

5-2-3. Quantification de la quantité de fer dans les cristaux après réticulation²¹³

La gamme d'étalonnage est préparée à partir d'une solution de sulfate d'ammonium ferreux hexahydraté (sel de Mohr) à 1 mg.mL⁻¹. Six échantillons contenant une concentration en fer graduelle (de 19,2 à 96,2 µmol.L⁻¹) sont préparés puis mixés avec de l'acide pyroglutamique à 1 M pendant 1 h. Ensuite, 1 mM de bathophénanthroline disulfate, 0,2 M d'ascorbate de sodium et une solution saturée d'acétate d'ammonium sont ajoutés et le milieu réactionnel est incubé pendant 15 min à température ambiante. Après l'incubation, l'absorbance est lue à 535 nm. Pour la quantification du fer dans les cristaux, 10, 20 ou 100 cristaux sont traités en suivant le même protocole que pour la gamme d'étalonnage.

Ratio protéine/fer : 0,97.

5-2-4. Concentration finale de catalyseur

Les expériences de catalyse sont réalisées avec 100 **CLEC NikA/Fe-Lx** dans 40 µL d'une solution de CH₃CN/H₂O 1/1 ce qui correspond à une concentration finale de catalyseur d'environ 31 µM (déterminée par SEC-MALLS)

5-3. Procédures catalytiques

5-3-1. Procédure générale d'hydroxychloration d'alcènes en présence de KHSO₅ et de NaCl

Les catalyses sont réalisées avec un ratio catalyseur/substrat/oxydant/chlorure de 1/1000/750/1500. La concentration en catalyseur est de 31 µM.

On utilise un lot de 100 **CLEC NikA/Fe-Lx**. Le surnageant est enlevé afin d'obtenir un volume final de 26 µL. Ensuite, sont ajoutés dans l'ordre, 1,5 µL d'une solution de substrat à 0,82 M (1,23 µmol ; 1000 éq.) dans CH₃CN, 6 µL d'une solution de NaCl à 0,31 M (1,85 µmol ; 1500 éq.) dans H₂O et 6,3 µL d'une solution d'Oxone® à 0,29 M (0,92 µmol ; 750 éq.) dans H₂O (volume final de 40 µL). Le mélange est agité à température ambiante pendant 3 h. Ensuite, sont additionnés 1,5 µL de benzophénone à 0,1 M (0,15 µmol) dans le DCE et le milieu réactionnel est extrait par 60 µL d'AcOEt. La phase organique est analysée par GC/MS.

Pour les expériences de cinétique, chaque point correspond à une expérience de catalyse isolée.

5-3-2. Procédure générale pour la catalyse d'oxydation de l' α -méthylstyrène avec différents oxydants

Les catalyses sont réalisées avec un ratio catalyseur/substrat/oxydant/chlorure de 1/1000/750/1500. La concentration en catalyseur est de 31 μ M.

Différents oxydants sont testés avec les **CLEC NikA/Fe-L2** (O_2 /DTT, H_2O_2 , CH_3CO_3H , *m*-CPBA, *t*-BuOOH, NaOCl et $KHSO_5$). Ces expériences sont réalisées selon la procédure générale de la catalyse d'hydroxychloration avec des modifications mineures : 1,5 μ L d'une solution d'oxydant à 0,62 M (0,92 μ mol) dans H_2O au lieu de 6,3 μ L d'Oxone® à 0,29 M. Le temps de réaction varie entre 30 minutes et 3 heures.

5-3-3. Expériences de stabilité avec les CLEC NikA/Fe-Lx

Pour les études de stabilité, un lot de 100 **CLEC NikA/Fe-Lx** est utilisé afin de réaliser une première réaction de catalyse en accord avec la procédure générale d'hydroxychloration des alcènes. Ensuite, les cristaux sont lavés par 3 fois 1 mL d'une solution CH_3CN/H_2O 1/1 avant d'être réutilisés dans les mêmes conditions réactionnelles.

Pour les études de rechargement, 50 μ L d'une solution de $FeCl_3$ ou de complexe **Fe-Lx** à 50 mM dans CH_3CN sont ajoutés à la solution contenant les **CLEC NikA/Fe-Lx** et le milieu réactionnel est agité pendant 3 h à température ambiante avant d'être lavés par 5 fois 1 mL d'une solution CH_3CN/H_2O 1:1 afin d'enlever l'excès de complexe de la solution. Puis la procédure standard de catalyse est réalisée. Les rechargements sont effectués aux run n°7, 9, 11 et 13.

5-3-4. Hydroxychloration d'alcènes en présence de DMPO

Cette expérience est réalisée en accord avec la procédure générale d'hydroxychloration des alcènes avec une modification mineure : 3 μ L de DMPO à 0,62 M (1,85 μ mol ; 1500 éq.) sont ajoutés avant l'Oxone® à la réaction standard.

5-3-5. Variations expérimentales pour l'hydroxychloration d'alcènes avec les CLEC NikA/Fe-Lx

Détermination du pH optimum

Pour cette étude, 4 pH différents ont été testés avec les **CLEC NikA/Fe-Lx** (1,5 ; 3 ; 4,5 ; 6). Les expériences ont été réalisées en présence de 0, 1, 2 ou 3 μL d'une solution de NaOH à 300 mM selon la procédure générale.

Insertion d'alcools au cours de l'hydroxychloration avec un ratio C/S/O/Cl⁻ 1/500/600/1000

On utilise un lot de 100 **CLEC NikA/Fe-Lx** stockés dans un mélange CH_3CN /alcool 1/1. Le surnageant est enlevé afin d'obtenir un volume final de 30 μL . Ensuite, sont additionnés dans l'ordre, 1,5 μL d'une solution à 0,41 M de substrat (0,615 μmol ; 500 éq.) dans CH_3CN , 4 μL d'une solution de NaCl à 0,31 M (1,23 μmol ; 1000 éq.) dans H_2O et 5 μL d'une solution d'Oxone® à 0,29 M (0,725 μmol ; 600 éq.) dans H_2O , (volume final de 40 μL). La réaction est agitée à température ambiante pendant 3 h. Ensuite, sont additionnés 1,5 μL de benzophénone à 0,1 M (0,15 μmol) dans le DCE et le milieu réactionnel est extrait par 60 μL d'AcOEt. La phase organique est analysée par GC/MS.

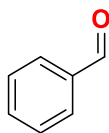
5-3-6. Expériences de RPE

Pour les expériences en RPE, le milieu réactionnel est testé directement sans extraction et à température ambiante.

6. Réactivité activation d'O₂ par les CLEC

6-1. Caractérisation des références

Benzaldéhyde (7a)

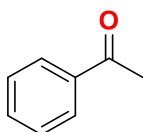


Produit commercial.

GC : programme A (t.r. = 7,46 min).

HPLC : -

Acétophénone (7c)

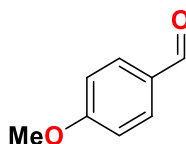


Produit commercial.

GC : programme A (t.r. = 8,99 min).

HPLC : -

Para-anisaldéhyde (7d)

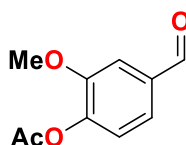


Produit commercial.

GC : programme A (t.r. = 11,40 min)

HPLC : -

Acétate de vanilline (7l)

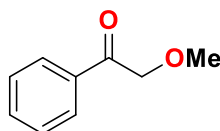


Produit commercial.

GC : programme B (t.r. = 7,42 min).

HPLC : -

2-Méthoxyacétophénone (7m)



Produit commercial.

GC : programme A (t.r. = 11,21 min).

HPLC : -

6-2. Procédures catalytiques

6-2-1. Procédure générale d'activation d'O₂ par les CLEC

Les catalyses sont réalisées avec un ratio catalyseur/substrat/DTT de 1/1000/750. La concentration en catalyseur est de 31 μM.

On utilise un lot de 100 **CLEC NikA/Fe-Lx**. Le surnageant est enlevé afin d'obtenir un volume final de 36 μL. Ensuite, sont ajoutés successivement, 1,5 μL d'une solution de substrat à 0,82 M (1,23 μmol ; 1000 éq.) dans CH₃CN et 3 μL d'une solution de DTT à 0,62 M (0,92 μmol) dans H₂O (volume final de 40 μL). Le mélange est agité à température ambiante pendant 3 heures. Ensuite, sont additionnés 1,5 μL de benzophénone à 0,1 M (0,15 μmol) dans le DCE et le milieu réactionnel est extrait par 60 μL d'AcOEt. La phase organique est analysée par GC/MS.

Pour les expériences de cinétique, chaque point correspond à une expérience de catalyse isolée.

6-2-2. Suivi UV-Visible de la réduction du complexe Fe-L2 en conditions anaérobies

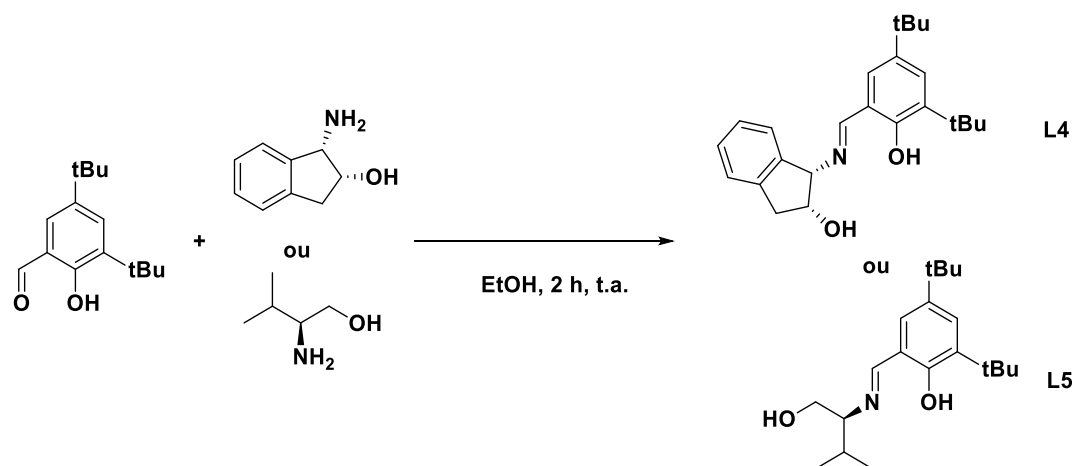
Ces études spectroscopiques sont réalisées en boîte à gants sur 100 μL d'une solution de complexe **Fe-L2** à 1 mM (0,1 μmol ; 1 éq.) dans une solution CH₃CN/H₂O 1/1. Sont additionnés, 12 μL d'une solution de DTT à 0,62 M (7,5 μmol ; 75 éq.) dans H₂O et la disparition de la bande LMCT est suivie par UV-Visible pendant 45 min. A la fin de la manipulation, le complexe est exposé à l'air afin d'observer la réapparition de la bande.

7. Réactivité tandem

7-1. Synthèse

7-1-1. Synthèse des complexes VO-L4 et V-L5

7-1-1-1. Synthèse des ligands L4 et L5²²³



Le 3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroxybenzaldéhyde (100 mg ; 427 μmol ; 1 eq.) est dissous dans 3 mL d'EtOH. Puis, l'amine (427 μmol ; 1 eq.) est additionné petit à petit en 15 min. La solution devient très rapidement jaune. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à température ambiante puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris avec 3 fois 15 mL de DCM et évaporé afin d'obtenir un solide jaune.

Caractéristiques de L4

R% = 99 %.

Solide jaune.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3), δ : 8,65 (s, 1H), 7,47 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 7,34-7,21 (m, 5H), 4,84 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), 4,72 (m, 1H), 3,23 (ABX, $J = 5,8$ Hz, $J = 15,9$ Hz, 1H), 3,21 (ABX, $J = 4,9$ Hz, $J = 16,0$ Hz, 1H), 2,23 (sl, 1H), 1,46 (s, 9H), 1,36 (s, 9H).

Caractéristiques de L5

R% = 95 %.

Solide jaune.

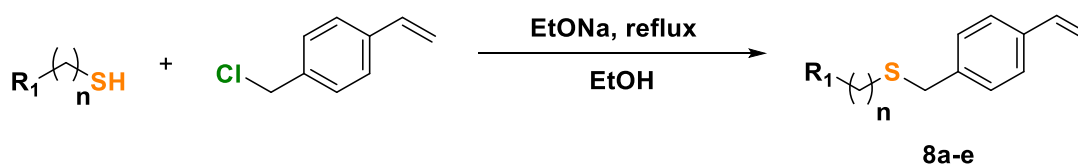
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3), δ : 8,41 (s, 1H), 7,47 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 3,86-3,79 (m, 2H), 3,09 (sl, 1H), 2,02-1,96 (m, 1H), 1,48 (s, 9H), 1,40 (s, 9H), 1,01-0,97 (m, 6H).

7-1-1-2. Préparation des solutions stocks de complexe VO-L4, VO-L5, Fe-L4 et Fe-L5

Dans un Falcon de 15 mL, le ligand (1 μmol ; 1 éq.) est dissous dans 10 mL de DCM puis 26,5 mg de VO(acac)₂ (1 μmol ; 1 éq.) ou 16,25 mg de FeCl₃ (1 μmol ; 1 éq.) est additionné. La solution est laissée sous agitation pendant 10 h avant d'être utilisée telle quelle.

7-1-2. Synthèse des substrats thioéthers

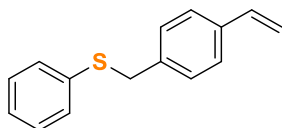
7-1-2-1. Les composés thioéthers substrats de motif de base 4-vinylthiobenzyléther



N°	R ₁	n
8a	Ph	0
8b	Naphtyle	0
8c	Tolye	0
8d	Ph	1
8e	CH ₃	0

Procédure générale

Le thiol (3,12 mmol ; 1 éq.) et l'EtONa (637 mg ; 9,36 mmol ; 3 éq.) sont dissous dans 50 mL d'EtOH sous agitation. Le mélange est agité pendant 15 min puis le 4-chlorométhylstyrène (476 mg ; 3,12 mmol ; 1 éq.) est additionné. Le mélange réactionnel est porté à reflux et l'avancement de la réaction est suivi par CCM (éluant : pentane/AcOEt 95/5) (entre 2 h et 10 h de réaction). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est dilué avec 20 mL d'H₂O : soit, le produit réactionnel précipite et celui-ci est filtré et lavé à l'eau glacée, soit, il ne précipite pas et il est extrait avec du DCM. La phase organique est alors séchée sur Na₂SO₄, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite afin d'obtenir le produit thioéther pur.

Phényl(4-vinylbenzyl)thioéther (8a)

Rendement : 91 %.

Solide blanc.

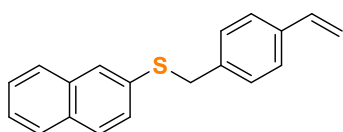
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 7,42-7,22 (m, 9H), 6,72 (dd, J = 17,8 Hz et J = 10,7 Hz, 1H), 5,75 (d, J = 17,7 Hz, 1H), 5,26 (d, J = 17,7 Hz, 1H), 4,14 (s, 2H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 137,3 ; 136,7 ; 136,6 ; 136,5 ; 130,0 ; 129,2 ; 129,0 ; 126,5 ; 113,9 ; 39,0.

MS : m/z = 226.

GC : programme D (t.r. = 8,41 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 1,95 min).

Naphtalèn-2-yl(4-vinylbenzyl)thioéther (8b)

Rendement : 95 %.

Solide blanc.

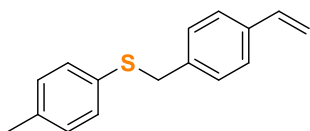
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 7,81-7,71 (m, 4H), 7,48-7,41 (m, 3H), 7,36-7,31 (m, 4H), 6,70 (dd, J = 17,6 Hz, J = 10,9 Hz, 1H), 5,73 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 5,24 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,23 (s, 2H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 136,6 ; 136,4 ; 133,8 ; 133,7 ; 131,9 ; 129,0 ; 128,3 ; 127,9 ; 127,8 ; 127,7 ; 127,1 ; 126,5 ; 126,4 ; 125,8 ; 113,8 ; 38,8.

MS : m/z = 276.

GC : programme E (t.r. = 13,85 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 2,38 min).

***p*-tolyl(4-vinylbenzyl)thioéther (8c)**

Rendement : 81 %.

Huile jaune.

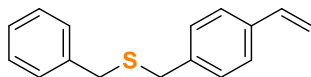
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 7,34 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,24 (d, J = 7,8 Hz, 4H), 7,08 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 6,71 (dd, J = 17,6 Hz, J = 10,8 Hz, 1H), 5,74 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 5,25 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,08 (s, 2H), 2,34 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 137,4 ; 136,6 ; 136,5 ; 132,4 ; 130,8 ; 129,6 ; 129,0 ; 126,3 ; 113,7 ; 39,6 ; 21,0.

MS : m/z = 240.

GC : programme D (t.r. = 8,90 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 1,99 min).

Benzyl(4-vinylbenzyl)thioéther (8d)

Rendement : 89 %.

Huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 7,37-7,25 (m, 9H), 6,73 (dd, J = 17,5 Hz, J = 10,9 Hz, 1H), 5,75 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 5,26 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 3,62 (s, 4H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 138,1 ; 137,8 ; 136,5 ; 136,4 ; 129,2 ; 129,0 ; 128,5 ; 127,0 ; 126,3 ; 113,7.

MS : m/z = 240.

GC : programme D (t.r. = 9,11 min).

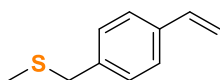
HPLC : programme 4 (t.r. = 1,87 min).

Méthyl(4-vinylbenzyl)thioéther (8e)

Rendement : 92 %.

Huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 7,39 (AB, J = 7,7 Hz, 2H),
7,29 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 6,73 (dd, J = 17,6 Hz et 10,9 Hz, 1H),
5,76 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 5,26 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 3,69 (s, 3H).



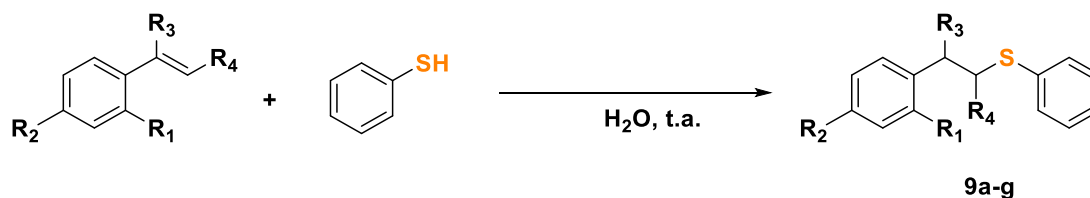
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 137,9 ; 136,5 ; 136,4 ; 129,0 ;
126,3 ; 113,6 ; 38,1 ; 14,9.

MS : m/z = 164.

GC : programme D (t.r. = 5,06 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 1,80 min).

7-1-2-2. Les composés thioéthers (références pour la réaction de couplage)

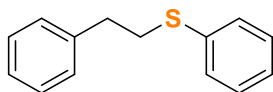


N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
9a	H	H	H	H
9b	H	F	H	H
9c	H	Br	H	H
9d	Br	H	H	H
9e	H	OMe	H	H
9f	H	H	H	CH ₃
9g	H	H	CH ₃	H

Procédure générale

L'alcène (177 μmol ; 1 éq.) et le thiophénol (21,9 mg ; 177 μmol ; 1 éq.) sont dissous dans 6 mL d'H₂O. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant une nuit à température ambiante puis est extrait avec du DCM. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Dans certains cas, le produit est obtenu pur avec un rendement de 99 %. Sinon, une purification sur gel de silice est réalisée avec comme éluant le CHCl₃.

Phénéthyl(phényl)thioéther (9a)



Rendement : 97 %.

Huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) : δ = 7,53 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,35-7,31 (m, 4H), 7,26-7,22 (m, 3H), 3,23-3,19 (m, 2H), 2,98-2,94 (m, 2H).

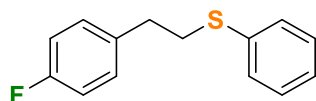
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 129,2 ; 129,0 ; 128,5 ; 126,5 ; 126,0 ; 35,7 ; 35,1.

MS : m/z = 214.

GC : programme D (t.r. = 7,67 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 1,9 min).

(4-fluorophénéthyl)(phényl)thioéther (9b)



Rendement : 95 %.

Huile jaune.

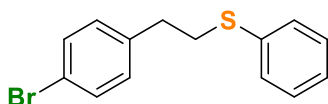
Purification : colonne de gel de silice avec comme éluant CHCl₃.

MS : m/z = 232.

GC : programme D (t.r. = 7,76 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 1,8 min).

(4-bromophénéthyl)(phényl)thioéther (9c)



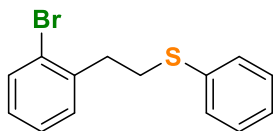
Rendement : 98 %.

Huile jaune.

MS : m/z = 292.

GC : programme D (t.r. = 9,74 min).

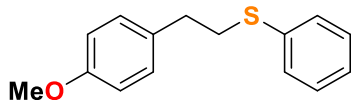
HPLC : programme 4 (t.r. = 1,9 min).

(2-bromophényl)(phényl)thioéther (9d)**Rendement :** 98 %.

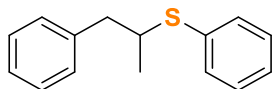
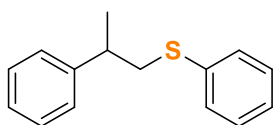
Huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 7,56 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,34 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 7,25 (t, J = 7,3 Hz, 3H), 7,14-7,09 (m, 1H), 3,24-3,06 (m, 4H).

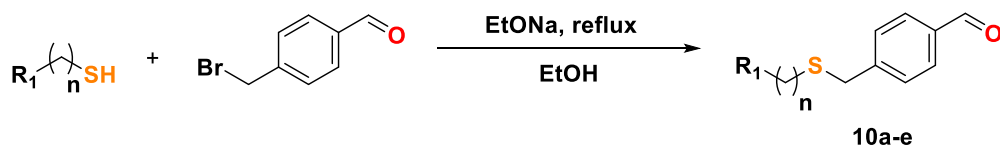
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 132,9 ; 130,9 ; 129,4 ; 128,9 ; 128,3 ; 127,5 ; 126,1 ; 36,3 ; 33,3.

MS : m/z = 292.**GC :** programme D (t.r. = 9,46 min).**HPLC :** programme 4 (t.r. = 1,9 min).**(4-méthoxyphényl)(phényl)thioéther (9e)****Rendement :** 97%.

Huile jaune.

MS : m/z = 244.**GC :** programme D (t.r. = 9,37 min).**HPLC :** programme 4 (t.r. = 2,1 min).**(phényl(1-phénylpropan-2-yl)thioéther (9f)****MS :** m/z = 228.**GC :** programme D (t.r. = 10,00 min).**HPLC :** programme 4 (t.r. = 1,8 min).**Phényl(2-phénylpropyl)thioéther (9g)****MS :** m/z = 228.**GC :** programme D (t.r. = 8,15 min).**HPLC :** programme 4 (t.r. = 1,8 min).

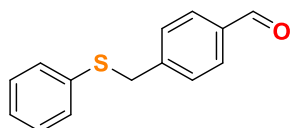
7-1-3. Synthèse des références avec le motif 4-carboxyaldehydethiobenzyléther



N°	R ₁	n
10a	Ph	0
10b	Naphtyle	0
10c	Tolye	0
10d	Ph	1
10e	CH ₃	0

Procédure générale

Le thiol (2,01 mmol ; 1 éq.) et l'EtONa (410 mg ; 6,03 mmol ; 3 éq.) sont dissous dans 30 mL d'EtOH sous agitation. Le mélange est agité pendant 15 min puis le (4-bromométhyl)benzaldehyde (400 mg ; 2,01 mmol ; 1 éq.) est additionné. Le mélange réactionnel est porté à reflux et l'avancement de la réaction est suivi par CCM (pentane/AcOEt 95/5) (entre 2 h et 5 h de réaction). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est dilué avec 20 mL d'H₂O : soit, le produit réactionnel précipite et celui-ci est filtré et lavé à l'eau glacée, soit, il ne précipite pas et il est extrait avec du DCM. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite afin d'obtenir le produit thioéther pur.

4-((Phénylthio)méthyl)benzaldehyde (10a)

Rendement : 94 %.

Huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 9,99 (s, 1H), 7,80 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,42 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,29-7,25 (m, 5H), 4,15 (s, 2H).

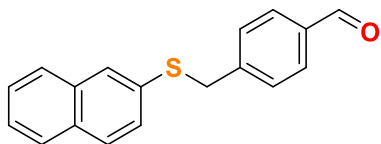
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 191,7 ; 144,9 ; 135,4 ; 135,1 ; 130,7 ; 129,9 ; 129,4 ; 129,0 ; 127,0 ; 39,3.

MS : m/z = 228.

GC : programme D (t.r. = 9,31 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 3,51 min).

4-((Naphthalèn-2-yl)thio)méthyl)benzaldéhyde (10b)



Rendement : 91 %.

Solide blanc.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 9,99 (s, 1H), 7,82-7,72 (m, 6H), 7,48-7,40 (m, 5H), 4,26 (s, 2H).

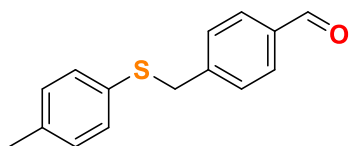
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 191,7 ; 144,8 ; 135,4 ; 133,6 ; 132,6 ; 132,1 ; 130,0 ; 129,4 ; 129,0 ; 128,6 ; 128,1 ; 127,7 ; 127,2 ; 126,6 ; 126,1 ; 39,2.

MS : m/z = 278.

GC : programme E (t.r. = 17,02 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 4,79 min).

4-((p-tolylthio)méthyl)benzaldéhyde (10c)



Rendement : 88 %.

Solide beige.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 9,99 (s, 1H), 7,79 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,39 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,21 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,08 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 4,10 (s, 2H), 2,33 (s, 3H).

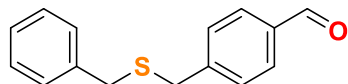
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 191,8 ; 145,3 ; 137,3 ; 135,3 ; 131,6 ; 131,2 ; 129,9 ; 129,8 ; 129,4 ; 40,0 ; 21,1.

MS : m/z = 242.

GC : programme D (t.r. = 9,76 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 3,25 min).

4-((Benzylthio)méthyl)benzaldéhyde (10d)



Rendement : 97 %.

Huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 10,02 (s, 1H), 7,85 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,45 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,34-7,30 (m, 5H), 3,67 (s, 2H), 3,63 (s, 2H).

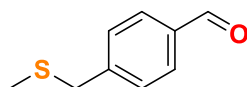
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 191,7 ; 145,5 ; 137,6 ; 135,3 ; 130,0 ; 129,6 ; 129,0 ; 128,6 ; 127,2 ; 35,8 ; 35,4.

MS : m/z = 242.

GC : programme D (t.r. = 10,13 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 3,24 min).

4-((Méthylthio)méthyl)benzaldéhyde (10e)



Rendement : 84 %.

Huile jaune.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 10,01 (s, 1H), 7,85 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,48 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 3,73 (s, 2H), 2,01 (s, 3H).

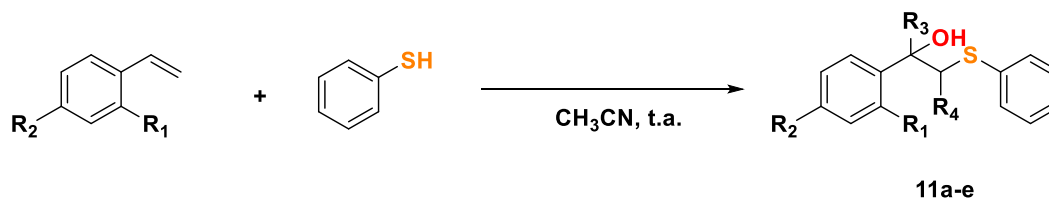
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 191,7 ; 145,6 ; 135,3 ; 130,0 ; 129,5 ; 38,2 ; 15,0.

MS : m/z = 166.

GC : programme D (t.r. = 5,06 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 3,18 min).

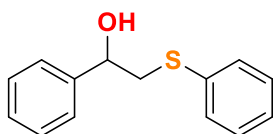
7-1-4. Synthèse des alcools



N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
9a	H	H	H	H
9b	H	F	H	H
9c	H	Br	H	H
9d	Br	H	H	H
9e	H	OMe	H	H
9f	H	H	H	CH ₃
9g	H	H	CH ₃	H

*Procédure générale*²³⁸

L'alcène (1 mmol ; 1 éq.) et le thiophénol (742 mg ; 1 mmol ; 1 éq.) sont dissous dans 25 mL de DMF. La réaction est agitée pendant 2 jours à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec 20 mL d'H₂O et extrait avec du DCM. Les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite afin d'obtenir l'alcool correspondant.

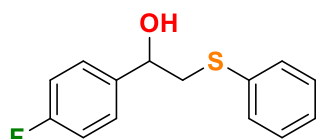
1-Phényl-2-(phénylthio)éthan-1-ol (11a)

Caractérisé selon la référence.²³⁸

MS : m/z = 230.

GC : programme D (t.r. = 8,99 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 3,6 et 3,8 min).

1-(4-fluorophényl)-2-(phénylthio)éthan-1-ol (11b)

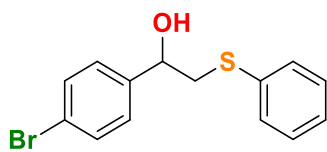
Caractérisé selon la référence.²³⁸

MS : m/z = 248.

GC : programme D (t.r. = 8,78 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 3,5 et 3,8 min).

1-(4-Bromophényl)-2-(phénylthio)éthan-1-ol (11c)



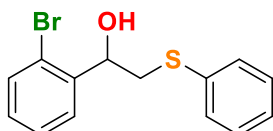
Caractérisé selon la référence.²³⁸

MS : m/z = 308.

GC : programme D (t.r. = 11,46 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 2,9 et 3,2 min).

1-(2-Bromophényl)-2-(phénylthio)éthan-1-ol (11d)



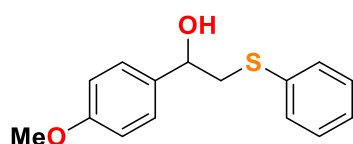
Caractérisé selon la référence.²³⁸

MS : m/z = 308.

GC : programme D (t.r. = 10,90 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 2,8 et 3,1 min).

1-(4-Méthoxyphényl)-2-(phénylthio)éthan-1-ol (11e)



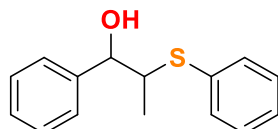
Caractérisé selon la référence.²³⁸

MS : m/z = 260.

GC : programme D (t.r. = 10,19 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 5,3 et 6,4 min).

1-phényl-2-(phénylthio)propan-1-ol (11f)



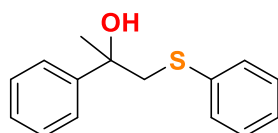
Caractérisé selon la référence.²³⁸

Masse : m/z = 244.

GC : programme D (t.r. = 8,79 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 3,1 et 3,4 min).

2-phényl-1-(phénylthio)propan-2-ol (11g)



Caractérisé selon la référence.²³⁸

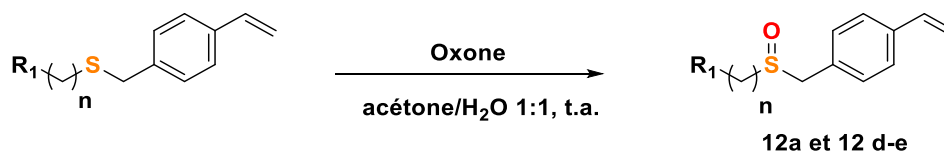
Masse : m/z = 244.

GC : programme D (t.r. = 8,79 min).

HPLC : programme 4 (t.r. = 3,1 et 3,4 min).

7-1-5. Synthèse des sulfoxydes de référence

7-1-5-1. Les composés sulfoxydes pour la réaction tandem de coupure oxydante

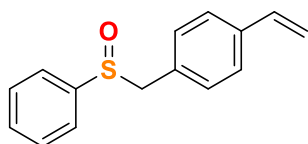


N°	R ₁	n
12a	Ph	0
12d	Ph	1
12e	CH ₃	0

Procédure générale

Le thioéther (0,713 mmol ; 1 éq.) est dissous dans 20 mL d'un mélange acétone/H₂O 1/1. L'Oxone® (0,785 mmol ; 1,1 éq.) est ensuite ajouté, au fur et à mesure pendant 3 min, sous agitation et à température ambiante. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (CHCl₃/acétone 9/1) (temps de réaction entre 10 min et 2 h). Le milieu réactionnel est extrait avec du DCM et les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et le solvant est évaporé. Le sulfoxyde obtenu est alors trituré dans le pentane afin d'obtenir le composé pur.

4-((Méthylthio)méthyl)benzaldéhyde (12a)



Rendement : 95 %.

Solide blanc.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 7,55-7,38 (m, 5H), 7,3 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 6,68 (dd, J = 17,6 Hz, J = 10,9 Hz, 1H), 5,74 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 5,27 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,17 (AB, J = 12,5 Hz, 1H), 4,07 (AB, J = 12,5 Hz, 1H).

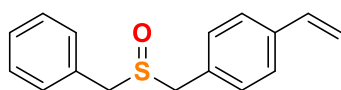
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 136,2 ; 134,5 ; 133,2 ; 131,9 ; 131,3 ; 130,6 ; 130,1 ; 129,7 ; 128,3 ; 126,3 ; 124,6 ; 114,5 ; 63,1.

MS : m/z = 242.

GC : -

HPLC : programme 4 (t.r. = 19,9 et 21,6 min).

1-((Benzylsulfinyl)méthyl)-4-vinylbenzène (12d)



Rendement : 77 %.

Solide blanc.

RMN ¹H (MeOD, 300 MHz), δ : 7,66-7,49 (m, 9H), 6,94 (dd, J = 17,6 Hz, J = 10,9 Hz, 1H), 6,0 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 5,45 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 4,37 (2 x AB, J = 12,9 Hz, 2 x 1H), 4,15 (2 x

AB, J = 12,9 Hz, 2x 1H).

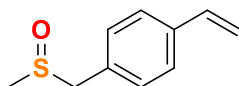
RMN ¹³C (MeOD, 75 MHz), δ : 139,7 ; 138,1 ; 138,0 ; 132,5 ; 132,2 ; 132,0 ; 131,9 ; 130,4 ; 130,0 ; 128,1 ; 115,3 ; 58,8 ; 58,5.

MS : m/z = 256.

GC : -

HPLC : programme 4 (t.r. = 21,6 et 24,4 min).

1-((Méthylsulfinyl)méthyl)-4-vinylbenzène (12e)



Rendement : 85 %.

Solide blanc.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 7,43 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,26 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 6,72 (dd, J = 17,7 Hz, J = 10,8 Hz, 1H), 5,78 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 5,29 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 4,06 (AB, J = 12,6 Hz, 1H), 3,93 (AB, J = 12,6 Hz, 1H), 2,47 (s, 3H).

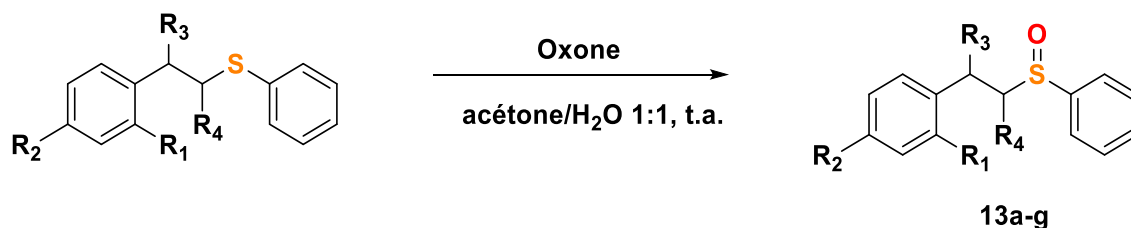
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz), δ : 137,8 ; 136,1 ; 130,2 ; 129,0 ; 126,8 ; 114,7 ; 60,1 ; 37,3.

MS : m/z = 180.

GC : -

HPLC : programme 4 (t.r. = 24,0 et 29,8 min).

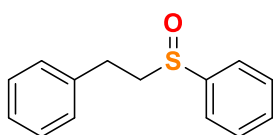
7-1-5-2. Les composés sulfoxydes pour la réaction de couplage



N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
13a	H	H	H	H
13b	H	F	H	H
13c	H	Br	H	H
13d	Br	H	H	H
13e	H	OMe	H	H
13f	H	H	H	CH ₃
13g	H	H	CH ₃	H

Procédure générale

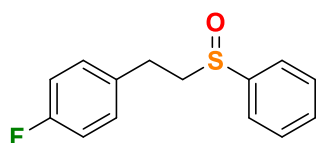
Le composé thioéther (85 μmol ; 1 éq.) est dissous dans 2,5 mL d'une solution H₂O/acétone 1/1. Ensuite, 512 mg d'Oxone® (85 μmol ; 1,1 éq.) sont ajoutés progressivement en 10 min. Le milieu réactionnel est mis sous agitation pendant 2 h à température ambiante puis est extrait avec du DCM. Les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄ et filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié sur gel de silice avec comme éluant le CHCl₃ puis CHCl₃/acétone 1/1.

(Phénéthylsulfinyl)benzène (13a)

Caractérisé selon la référence.²³⁹

MS : m/z = 230.

HPLC : programme 4 (t.r. = 7,9 et 10,0 min).

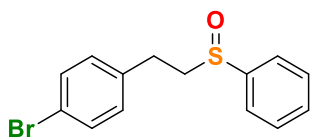
1-Fluoro-4-(2-(phénylsulfinyl)éthyl)benzène (13b)

Caractérisé selon la référence.²⁴⁰

MS : m/z = 248.

HPLC : programme 4 (t.r. = 8,2 et 10,5 min).

1-bromo-4-(2-(phénylsulfinyl)éthyl)benzène (13c)

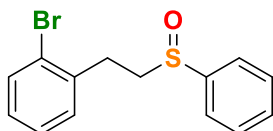


Caractérisé selon la référence.²³⁹

MS : m/z = 308.

HPLC : programme 4 (t.r. = 8,1 min et 10,5 min).

1-Bromo-2-(2-(phénylsulfinyl)éthyl)benzène (13d)

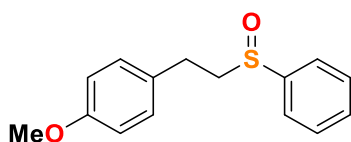


Caractérisé selon la référence.²³⁹

MS : m/z = 308.

HPLC : programme 4 (t.r. = 7,6 min et 9,6 min).

1-Méthoxy-4-(2-(phénylsulfinyl)éthyl)benzène (13e)

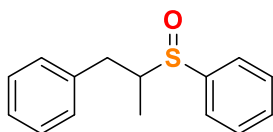


Caractérisé selon la référence.²³⁹

MS : m/z = 260.

HPLC : programme 4 (t.r. = 12,5 et 15,7 min).

((1-phénylpropan-2-yl)sulfinyl)benzène (13f)

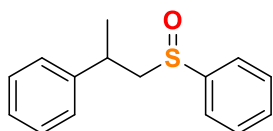


Caractérisé selon la référence.²³⁹

MS : m/z = 244.

HPLC : programme 4 (t.r. = 9,2 et 10,8 min).

((2-phénylpropyl)sulfinyl)benzène (13g)

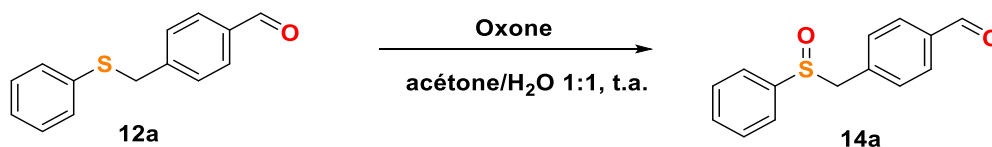


Caractérisé selon la référence.²³⁹

MS : m/z = 244.

HPLC : programme 4 (t.r. = 9,3 et 11,4 min).

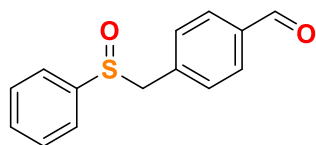
7-1-5-3. Synthèse des sulfoxydes/aldéhydes



Procédure générale

Le thioéther (0,713 mmol ; 1 éq.) est dissous dans 20 mL d'un mélange acétone/H₂O 1/1. L'Oxone® (240 mg ; 0,785 mmol ; 1,1 éq.) est ensuite ajouté, au fur et à mesure en 3 min, sous agitation et à température ambiante. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (CHCl₃/acétone 9/1). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est extrait avec du DCM. Les phases organiques sont combinées, séchées sur Na₂SO₄ et filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite afin d'obtenir une poudre blanche.

4-((Phénylsulfinyl)méthyl)benzaldéhyde (14a)



Rendement : 87%.

Solide blanc.

Purification : colonne de gel de silice avec éluant : acétone/CHCl₃ 1/9.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz), δ : 10,01 (s, 1H), 7,77 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,50-7,37 (m, 5H), 7,15 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 4,16 (AB, J = 12,6 Hz, 1 H), 4,07 (AB, J = 12,6 Hz, 1H).

MS : m/z = 228.

GC : -

HPLC : programme 4 (t.r. = 27,4 et 33,0 min).

7-2. Procédures catalytiques

7-2-1. Procédure générale pour la catalyse de coupure oxydante des alcènes en présence de DTT

Les catalyses sont réalisées avec un ratio catalyseur/substrat/DTT de 1/1000/1500. La concentration en catalyseur est de 31 μM.

Les mêmes expériences peuvent être réalisées avec le complexe seul. Pour cela, sont additionnés successivement, 1,5 μL de complexe **Fe-L1** ou **Fe-L2** à 800 μM (1,24 nmol ; 1 éq.) dans CH_3CN , 36 μL d'une solution $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1, 1,5 μL d'une solution de substrat à 0,82 M (1,23 μmol ; 1000 éq.) dans le DMF et 3 μL d'une solution de DTT à 0,616 M dans H_2O (1,85 μmol ; 1500 éq.). Le mélange est agité à température ambiante pendant 1h30. Ensuite, sont additionnés 1,5 μL de benzophénone à 0,1 M (0,15 μmol) dans le DCE et le milieu réactionnel est extrait par 60 μL d'AcOEt. La phase organique est analysée par GC/MS.

Pour les expériences de cinétique, chaque point correspond à une expérience de catalyse isolée.

Les mêmes expériences peuvent être réalisées avec un lot de 100 **CLEC NikA/Fe-L1** ou **CLEC NikA/Fe-L2**, en boîte à gants, dans 34 μL d'une solution de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1 à la place du complexe **Fe-L1** ou **Fe-L2**.

7-2-2. Procédure générale pour la réaction de couplage alcène/thiol

Les catalyses sont réalisées avec un ratio catalyseur/substrat/thiophénol de 1/1000/1500. La concentration en catalyseur est de 31 μM .

Sont additionnés successivement, 1,5 μL de complexe **Fe-LIII** à 800 μM (1,24 nmol ; 1 éq.) dans CH_3CN , 32 μL d'une solution $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1, 3 μL d'une solution de substrat à 0,41 M (1,23 μmol ; 1000 éq.) dans CH_3CN et 3 μL d'une solution de thiophénol à 0,616 M (1,85 μmol ; 1500 éq.) dans CH_3CN . Le mélange est agité à température ambiante pendant 15 min. Ensuite, sont additionnés 1,5 μL de benzophénone à 0,1 M (0,15 μmol) dans le DCE et le milieu réactionnel est extrait par 60 μL d'AcOEt. La phase organique est analysée par GC/MS.

Pour les expériences de cinétique, chaque point correspond à une expérience de catalyse isolée.

Les mêmes expériences peuvent être réalisées avec un lot de 100 **CLEC NikA/Fe-LIII**, en boîte à gants, dans 34 μL d'une solution de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1 à la place du complexe **Fe-LIII**.

7-2-3. Procédure générale pour la catalyse de sulfoxydation des thioéthers en présence d'H₂O₂ et des complexes VO-L4

Dans un Eppendorf, 1 µL d'une solution de complexe **VO-L4** à 10 mM (10 nmol ; 1 éq.) dans le DCM est dilué dans 33 µL d'une solution CH₃CN/H₂O 1/1. Ensuite, 3 µL d'une solution de substrat à 0,41 M (1,23 µmol ; 125 éq.) dans CH₃CN et 3 µL d'une solution d'H₂O₂ à 0,616 M (1,85 µmol ; 190 éq.) dans H₂O sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est agité à température ambiante pendant 5 h puis est extrait par 60 µL d'AcOEt. La phase organique est analysée par HPLC.

Pour les expériences de cinétique, chaque point correspond à une expérience de catalyse isolée.

7-2-4. Procédure générale pour la catalyse tandem (coupure oxydante + sulfoxydation) des substrats n°9 en présence de DTT et d'H₂O₂

Les catalyses sont réalisées avec un ratio catalyseur/substrat/DTT/H₂O₂ de 1/1000/1500/1500. La concentration en catalyseur est de 31 µM.

Sont additionnés successivement, 1,5 µL de complexe **Fe-L2** à 800 µM (1,24 nmol ; 1 éq.) dans CH₃CN, 31 µL d'une solution CH₃CN/H₂O 1/1, 1,5 µL d'une solution de substrat à 0,82 M (1,23 µmol ; 1000 éq.) dans le DMF et 3 µL d'une solution de DTT à 0,616 M (1,85 µmol ; 1500 éq.) dans H₂O. La réaction est agitée à température ambiante pendant 2 h puis sont ajoutés 3 µL d'une solution d'H₂O₂ à 0,616 M dans H₂O (1,85 µmol ; 1500 éq.). La réaction est laissée sous agitation pendant 6 h supplémentaires. Le milieu est ensuite extrait par 60 µL d'AcOEt. La phase organique est analysée par GC/MS et par HPLC.

Les mêmes expériences peuvent être réalisées avec un lot de 100 **CLEC Nika/Fe-L2** dans 33 µL d'une solution de CH₃CN/H₂O 1/1 à la place du complexe **Fe-L2**.

7-2-5. Procédure générale pour la catalyse tandem (couplage + sulfoxydation) des substrats n°10 en présence de thiophénol et d'H₂O₂

La première réaction de catalyse (couplage) est réalisée avec un ratio catalyseur/substrat/thiophénol de 1/1000/1500. La deuxième réaction de catalyse (sulfoxydation) est réalisée avec un ratio catalyseur/substrat/H₂O₂ de 1/125/190. La

concentration en catalyseur pour la première réaction est de 31 μM et la concentration en catalyseur pour la deuxième réaction est de 248 μM .

Sont ajoutés successivement, 1,5 μL de complexe **Fe-LIII** à 800 μM (1,24 nmol ; 1 éq.) dans CH_3CN , 28 μL d'une solution de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1, 3 μL d'une solution de substrat à 0,41 M (1,23 μmol ; 1000 éq.) dans CH_3CN et 3 μL d'une solution de thiophénol à 0,616 M (1,85 μmol ; 1500 éq.) dans CH_3CN . Le mélange est agité à température ambiante pendant 15 min. Ensuite, sont additionnés 1 μL d'une solution de complexe VO-L4 à 10 mM (10 nmol ; 1 éq.) dans le DCM et 3 μL d'une solution d' H_2O_2 à 0,616 M (1,85 μmol ; 190 éq.) dans H_2O . Le mélange est agité à température ambiante pendant 5 h. Ensuite, le milieu réactionnel est extrait par 60 μL d'AcOEt. La phase organique est analysée par HPLC et GC/MS.

Les mêmes expériences peuvent être réalisées avec un lot de 100 CLEC **NikA/Fe-LIII** dans 30 μL d'une solution de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1/1 à la place du complexe **Fe-LIII**.

Références

225. S. Stoll and A. Schweiger, *Journal of Magnetic Resonance*, 2006, **178**, 42-55.
226. M. V. Cherrier, C. Cavazza, C. Bochet, D. Lemaire and J. C. Fontecilla-Camps, *Biochemistry*, 2008, **47**, 9937-9943.
227. W. Kabsch, *Acta Crystallographica Section D*, 2010, **66**, 125-132.
228. A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni and R. J. Read, *Journal of Applied Crystallography*, 2007, **40**, 658-674.
229. P. D. Adams, R. W. Grosse-Kunstleve, L.-W. Hung, T. R. Ioerger, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. J. Read, J. C. Sacchettini, N. K. Sauter and T. C. Terwilliger, *Acta Crystallographica Section D*, 2002, **58**, 1948-1954.
230. G. N. Murshudov, P. Skubak, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long and A. A. Vagin, *Acta Crystallographica Section D*, 2011, **67**, 355-367.
231. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott and K. Cowtan, *Acta Crystallographica Section D*, 2010, **66**, 486-501.
232. E. Boeri Erba and C. Petosa, *Protein Science*, 2015, **24**, 1176-1192.
233. K. Fukunaga, F. Uehara, K. Aritomo, A. Shoda, S. Hiki, M. Okuyama, Y. Usui, K. Watanabe, K. Yamakoshi, T. Kohara, T. Hanano, H. Tanaka, S. Tsuchiya, S. Sunada, K.-I. Saito, J.-i. Eguchi, S. Yuki, S. Asano, S. Tanaka, A. Mori, K. Yamagami, H. Baba, T. Horikawa and M. Fujimura, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, **23**, 6933-6937.
234. S. Lopez, L. Rondot, C. Leprêtre, C. Marchi-Delapierre, S. Ménage and C. Cavazza, *Journal of the American Chemical Society*, 2017, DOI: 10.1021/jacs.7b09343.
235. T. Kitamura, Y. Tazawa, M. H. Morshed and S. Kobayashi, *Synthesis*, 2012, **44**, 1159-1162.
236. S. D. F. Tozetti, L. S. d. Almeida, P. M. Esteves and M. C. S. d. Mattos, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2007, **18**, 675-677.
237. J. Iskra, S. Stavber and M. Zupan, *Chemical Communications*, 2003, DOI: 10.1039/B305629E, 2496-2497.
238. S.-F. Zhou, X. Pan, Z.-H. Zhou, A. Shoberu and J.-P. Zou, *The Journal of Organic Chemistry*, 2015, **80**, 3682-3687.
239. Y. Zhang, Z. R. Wong, X. Wu, S. J. L. Lauw, X. Huang, R. D. Webster and Y. R. Chi, *Chemical Communications*, 2017, **53**, 184-187.
240. H.-L. Yue and M. Klussmann, *Synlett*, 2016, **27**, 2505-2509.

Depuis la révolution industrielle, la chimie ne cesse de prospérer en développant des procédés de plus en plus performants souvent aux dépens de l'environnement. Dans le cadre du développement d'une chimie durable, des procédés catalytiques dans le domaine de la chimie d'oxydation sont mis en place en utilisant des métaux physiologiques et des oxydants doux. En combinant les avantages de la catalyse homogène et de la biocatalyse, de nouveaux catalyseurs bio-inspirés ont émergé, les métalloenzymes artificielles. Elles sont constituées d'un complexe inorganique, choisi en fonction de la réaction visée, qui est ancré au sein d'une protéine, qui apporte la sélectivité de la réaction. Au cours des travaux de cette thèse, de nouvelles métalloenzymes artificielles ont été créées par ancrage de divers complexes de Fe ou de Ru au sein de la protéine NikA. Dans un premier temps, l'hybride **NikA/Ru-bpza** a été synthétisé pour réaliser l'hydroxychloration d'alcènes en présence d'un iode hypervalent. Bien que d'excellentes propriétés catalytiques aient été obtenues, l'amélioration de la stabilité de ce type de catalyseurs, en particulier pour des réactions d'oxydation, reste un challenge important à relever pour leur utilisation au niveau industriel. Une des solutions est basée sur le développement de la catalyse hétérogène, en utilisant de cristaux de métalloenzymes artificielles grâce à la technologie CLEC (Cross-Linked Enzyme Crystals). Cette technologie permet, d'une part, d'améliorer la stabilité et la recyclabilité des catalyseurs, et d'autre part, d'élargir les conditions réactionnelles utilisées (solvants, pH, températures). Trois réactivités ont été développées à base de **CLEC NikA/FeL** : (i) la sulfoxydation de thioéthers, (ii) l'hydroxychloration d'alcènes en présence d'Oxone® et de chlore et (iii) la coupure oxydante d'alcènes par activation d'O₂. Ces résultats ont permis d'explorer de nouvelles réactivités en chimie cascade soit en combinant les CLEC mis au point, soit en combinant différents catalyseurs homogènes.

Since the industrial revolution, chemistry has continually thriven by developing new efficient processes at the expense of the environment. As an example, oxidation reactions are performed under harsh conditions with the use of toxic oxidants. With the emergence of green chemistry, catalytic processes using physiological metals and soft oxidants are privileged. Combining the advantages of biocatalysis and homogeneous catalysis, the design of novel bioinspired catalysts, consisting on the synthesis of artificial enzymes has recently emerged. These hybrids are composed of an inorganic complex, driving the reactivity of the enzyme, inserted into a protein, which drives the reaction selectivity. The thesis described new developments in original artificial metalloenzymes, based on the use of the NikA protein and Fe or Ru catalysts. First, a new hybrid has been developed by anchoring the **Ru-bpza** complex to NikA to catalyze alkene hydroxychloration with hypervalent iodine. Although excellent catalytic efficiencies were obtained, the stability improvement remains a major challenge for the industrial use of these catalytic processes, especially when oxidation chemistry is concerned. One possible strategy is based on the development of heterogeneous catalysis, by using a crystal/solution version of the artificial metalloenzymes thank to the cross-linked enzyme crystals (CLEC) technology. On the one hand, this technology allows to increase the stability and the recyclability of the catalysts. On the other hand, catalysis can be performed under a various reactions conditions (organic solvent, temperature, pH). Three reactivities have been developed with NikA/FeL-CLEC catalysts: (i) thioether sulfoxidation with NaOCl, (ii) alkene hydroxychloration with Oxone® and chloride source and (iii) oxidative cleavage of alkenes by O₂ activation. To go further, new reactivities in cascade reactions have been explored combining either NikA-based CLEC developed, or different homogenous catalysts.