



HAL
open science

Développement de nouveaux systèmes bio-hybrides pour la photocatalyse asymétrique

Lucile Chiari

► **To cite this version:**

Lucile Chiari. Développement de nouveaux systèmes bio-hybrides pour la photocatalyse asymétrique. Chimie organique. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT: 2019GREAV029 . tel-02477837

HAL Id: tel-02477837

<https://theses.hal.science/tel-02477837v1>

Submitted on 13 Feb 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie inorganique et bio-inorganique**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Lucile Chiari

Thèse dirigée par **Olivier Hamelin, Maître de conférences, Université Grenoble Alpes**, et codirigée par **Renaud Dumas, Directeur de Recherche, CNRS**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, Grenoble** et du **Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Grenoble**
dans l'**École Doctorale de Chimie et Science du Vivant**

Développement de nouveaux systèmes bio-hybrides pour la photocatalyse asymétrique

Thèse soutenue publiquement le **7 novembre 2019**,
devant le jury composé de :

Pr. Jean-Pierre Mahy,

Professeur des Universités, Université Paris 11, Président

Pr. Laurence Hecquet

Professeur des Universités, Université Clermont Auvergne, Rapportrice

Dr. Thierry Tron

Directeur de Recherche, CNRS Marseille, Rapporteur

Dr. Pascale Delangle

Chercheur, CEA Grenoble, Examinatrice

Dr. Rime Kerfah

PDG société NMRBio, IBS Grenoble, Examinatrice

Dr. Olivier Hamelin

Maître de conférences, Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse

Dr. Renaud Dumas

Directeur de Recherche, CNRS Grenoble, invité et Co-directeur de thèse



*A ma grand-mère,
J'espère que tu aurais été fière de moi*

Remerciements

Écrire ces remerciements a probablement été la partie la plus difficile de ce manuscrit. Car cela signifie tourner définitivement la page de cette aventure hors norme qu'est la thèse, qui contrairement à ce qu'on pourrait penser est loin d'être un travail solitaire mais une réelle aventure humaine tout autant que scientifique.

J'ai eu la chance de faire ma thèse à l'interface chimie-biologie, entre deux très bons laboratoires du CEA-Grenoble LPCV et LCBM, entre la recherche fondamentale et l'entreprise NMRBio. Cette diversité m'a donné l'opportunité de rencontrer énormément de gens issus de toutes disciplines et de différents univers. J'ai ainsi pu côtoyer des personnes formidables humainement et scientifiquement. Les mots ne pourront jamais traduire ce que chacune d'entre elle m'a apporté ni à quel point je leur suis reconnaissante de leur temps, de leur bienveillance et de leur générosité à mon égard.

Les collaborateurs

En premier lieu, je tiens à remercier tous les collaborateurs qui ont travaillé avec moi. Sans vous ce projet n'aurait jamais pu aller aussi loin. J'ai vraiment apprécié de travailler avec chacun d'entre vous et j'ai été impressionnée par votre investissement et votre disponibilité.

- Sylvie, merci d'aimer les projets bizarres et différents, j'ai ainsi eu l'opportunité de te connaître et quel plaisir ce fut de travailler avec toi. Grâce à toi, à ton expertise et à ta volonté, j'ai obtenu un des plus beaux résultats de ma thèse alors merci du fond du cœur.

- Stéphane R., merci de t'être investi autant dans un projet aussi éloigné de tes thématiques de recherche. C'était chaque fois un plaisir de passer te voir et profiter de ta bonne humeur et de ton langage si imagé et fleuri... encore merci de m'avoir laissé utiliser «ton gros bouzin».

- Philou, que de temps passé ensemble au cryobench pour réaliser les spectroscopies *in crystallo*... Merci d'avoir consacré autant de temps à ce projet, J'ai vraiment été impressionnée par tes connaissances et c'était toujours sympa de discuter avec toi et de profiter de tes «merveilleux» jeux de mots. Encore merci pour les spectres Raman



- David, merci de m'avoir initiée à la cristallographie des protéines et de m'avoir montré le fonctionnement des lignes de l'ESRF.

Je voudrais ensuite remercier mes deux directeurs de thèse Olivier Hamelin et Renaud Dumas, qui ont formé un duo aux compétences complémentaires l'un en chimie, l'autre en biologie. J'ai vraiment eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous deux. Vous avez su me donner un cadre qui m'a permis de m'exprimer pleinement et de prendre des initiatives tout en étant toujours présents en cas de difficultés. Vos encouragements et votre confiance m'ont portée tout au long de cette thèse.

- Renaud, merci de m'avoir patiemment formée à la purification de protéines et en particulier à cette façon délicate d'agiter les protéines sans les brusquer, pas comme une certaine chimiste qui fait tout mousser... Merci d'avoir partagé ton amour pour ces petits objets magnifiques que sont les cristaux de protéines. Merci de m'avoir confié LEAFY pour ce projet, je sais qu'elle est un peu comme ton enfant et je te promets que j'en ai pris grand soin et qu'elle n'a pas trop souffert entre mes mains ;).

- Oliv, J'aurais beaucoup trop à raconter depuis les TD de chimie orga à l'IUT en 2005, jusqu'à la soutenance de thèse en 2019 en passant par les cours de grandes classes de médicaments, un stage de M2 et deux contrats d'ingénieur. Je te vois comme mon maître Ioda, bon en plus grand et moins vert !!! Et en tant que jeune Padawan plus si jeune ;), je te remercie de m'avoir permis de réaliser mon rêve de thèse avec ce superbe sujet tout neuf, rien qu'à moi, qui réunissait toutes les thématiques que j'affectionne et avec lequel j'ai pu complètement m'exprimer et toucher du doigt le plaisir d'être chercheur. J'ai eu beaucoup de chance de partager avec toi tous ces différents projets, de NMRBio à la thèse.

NMR-Bio

Lorsqu'il y a presque 10 ans, jeune stagiaire de M2, j'ai commencé à travailler sur la synthèse de la thréonine, j'ai été émerveillée de découvrir vos projets, leurs ingéniosités et l'utilisation de la RMN pour l'étude des protéines. Merci de m'avoir fait confiance pour l'aventure NMRBio, J'ai vraiment apprécié de relever le défi des synthèses marquées. Vous m'avez donné goût au pluridisciplinarisme et c'est probablement pour cette raison que cette thèse a été si épanouissante pour moi. Encore merci à chacun d'entre vous Jérôme, Rime, Rida, Élodie, Pierre, Isabel, Lionel.

LPCV

Merci à tous de m'avoir si bien accueillie. Vous avez fait preuve d'une grande gentillesse à mon égard et avez toujours été prêts à m'aider et à me conseiller dans mes premiers pas balbutiants avec les bactéries.

- Manu, il y aurait tellement à dire... c'était vraiment sympa de travailler avec toi, merci d'avoir toujours pris le temps de répondre aux questions parfois bien naïves d'une chimiste apprentie biologiste. J'ai aussi beaucoup apprécié ton humour quelque peu piquant... Ah et j'allais oublier merci d'avoir créé les plasmides de mes Leafy.

- Élise, Merci pour ton soutien tout au long de ma thèse, ce fut un réel plaisir de discuter boutique avec toi. Je te souhaite bonne continuation pour la fin de ta thèse mais je suis certaine que le résultat sera top.

- Arnaud et Jérémy, l'avantage avec vous les bioinfo, c'est qu'on sait toujours où vous trouver... devant l'écran entre le siège et le clavier... Plus sérieusement, Merci de m'avoir toujours accueillie avec le sourire même et surtout dans les périodes difficiles, votre soutien a beaucoup compté pour moi.

Encore un grand Merci à vous tous : François, Gabby, PH, Marie, Sophie, Tiffany, Sylvie, Agnès, Michel, Chloé, Véro, Raquel, Aditya, Léonie, Elodie, Crispy, Imen, Younes, Pauline, Nelson, Davide.

LCBM

Vous m'avez accueillie pour la première fois en master 2 et régulièrement pendant presque 10 ans jusqu'au doctorat. Je vous considère comme ma famille de la science, et je suis intimement convaincue que c'est grâce à vous et à votre soutien qu'aujourd'hui j'ai pu réaliser mon rêve : être docteur. J'ai partagé tellement de bons moments avec chacun d'entre vous, qu'il me faudrait un autre manuscrit de thèse pour tout raconter.

- Stéphane M., Merci pour ta bienveillance et ta générosité, tu as su rester accessible et disponible malgré tes responsabilités de directeur de labo. C'était toujours un plaisir de discuter avec toi, de partager ton enthousiasme et ton amour de la science, sans oublier ton super sens de l'humour....

- Julien, merci pour ton aide et tes conseils précieux tout au long du projet. Dédicaces aux recettes Thermomix et à l'organisation des raclettes et crêpes parties du labo.

- Christine, merci pour ton soutien et pour tous les moments que nous avons partagés tout au long de cette thèse. Merci pour le ravitaillement en chocolat pendant la rédaction; le magnésium c'est important pour le cerveau! Et jamais je n'oublierai ta bienveillance à la veille de ma soutenance ...

- Hamid, je voudrais mettre en avant ton grand cœur certes accompagné d'un caractère bien trempé, d'un franc parlé légendaire et je préfère ne rien dire de ton humour... Merci de m'avoir apporté ton aide et tes conseils avisés quand j'en avais besoin.

- Carro, merci d'avoir toujours été là pour moi, d'être toujours de bonne humeur, toujours prête à rendre service. Tu es la maman des étudiants de BioCE et nous avons énormément de chance de t'avoir.

- Stéphane T. Merci pour tous ces bons moments au labo, tes bons conseils, ta passion communicative pour la paillasse, ta bonne humeur et tes bonnes vanes. Merci pour toutes les conversations bricolages, snowboard, hockey et pour le 14 juillet...

- Jenny, je nous revois encore au labo en train de discuter dans ton bureau ou le mien. Merci pour tout, ton soutien, nos petits coups de gueules, les discussions autour de la construction de ta maison et tous les autres moments qu'il serait trop long d'évoquer.

- Adina, que de discussions animées, partagées à la cantine; je ne mange plus jamais une faisselle sans penser à toi... Plus sérieusement, j'ai été impressionnée par ta force de caractère et ton énergie à défendre tes convictions.

- Murielle, je me rappelle à la grande époque des Nico, les vendredis après-midi où tu mettais ta blouse... Merci pour ta bienveillance à mon égard et tes conseils précieux sur le ruthénium.

- Christian, merci d'avoir partagé ton expérience au travers de toutes tes petites anecdotes. Petite pensée pour un des plus grands débats scientifiques de la cantine : « quelle est la différence entre un yaourt et une faisselle? »

- Christelle, je n'ai pas eu la chance de travailler avec toi, mais j'ai apprécié ta gentillesse et les moments partagés au café.

- Vincent, merci d'avoir largement partagé tes idées en matière de gestion et de politique scientifique, cela m'a beaucoup appris. Et merci de si bien choisir tes étudiants les Nico, Nathan, Juju.

- Victor, merci pour ta bonne humeur, ta bienveillance. Quel plaisir de te voir arriver chaque matin au café avec le sourire, un mot gentil, une anecdote ou un gâteau!

- Matthieu, je me rappelle les discussions partagées le soir au labo après 19h, ta passion communicative pour la science et sans oublier ton humour pince-sans-rire. Merci d'avoir toujours eu un mot ou une idée quand j'en ai eu besoin.

Les étudiants

J'ai également une pensée pour tous les anciens étudiants que j'ai côtoyé au cours de mes années au LCBM Stéphan, Bénédict, Denis, Jean, Johannes, Mohammad, Thibaut C., Mahamoud, Marine, Thibaut M., Simon, Elodie, Alice, Lien, Wissam, Jordi, James, Manu, Clémentine, Deborah, Marina, Marine, Umberto, Marc-André, Laurie- Anne, Charlene, Trévor, Kun, Tim, Nick, Mano, Bertrand et tous ceux que j'oublie sûrement ...

Grâce à vous l'ambiance a toujours été très sympa et vivante. Petites dédicaces à la soirée bières du Jeudi et au blind test le mardi au «tords boyaux»...

Les anciens Solycat Juju, Les nico, Nathan, Thibault votre bonne humeur, votre humour si impertinent ont pour beaucoup participé à l'ambiance du labo de synthèse; il n'a plus jamais été le même après votre départ.

Laurianne, Jojo, Sarah, Marila mes coloc de bureau, grâce à vous tous, le bureau des étudiants était le meilleur du LCBM...

L'ambiance était toujours au top, sympa et détendue. En passant la porte, nous étions sûrs de trouver une oreille attentive, de l'aide, un conseil ou une idée quand nous étions dans la difficulté. Cette compréhension mutuelle née du partage des petits bonheurs et grosses galères du labo.

- Laurianne que d'épreuves traversées mais toujours avec le sourire et une gentillesse hors norme avec tes collègues. Ta détermination sans faille m'a toujours beaucoup impressionnée et je suis vraiment souffiée de ce que tu as accompli pendant ta thèse et après.

- Sarah, il y aurait tellement à dire, tellement de petits moments partagés, les gouters, les chansons Disney, la boîte de bonbons sur ton bureau (ma torture quotidienne), les discussions sur nos projets, le congrès Eurobic à Birmingham... Merci pour ton soutien au labo (même si tu m'as laissée tomber pour ma dernière année, je te pardonne☺) et en dehors. Tu resteras ma princesse chèvre préférée !!!

- Jojo, que de bons moments partagés, merci d'avoir assuré l'ambiance musicale du bureau; tu as été un DJ au top. Petite dédicace à tous tes délires, tellement drôles... Mon bras gauche ne sera plus jamais le même après avoir partagé tes longs mois de rédaction...



- Marila, je regrette que tu n'ai pas partagé notre bureau dès le début, car t'avoir à mes côtés pendant la rédaction a vraiment été un soutien important. Te voir si concentrée et efficace dans l'écriture a contribué à me booster et à rendre cette période moins dure surtout lorsque la journée se finissait autour d'une bonne glace...

- Chloé, tu n'étais pas dans notre bureau mais c'était tout comme. Merci pour les gouters, les discussions en tout genre, en particulier celles des vendredi soir de flemme-de-prendre-la-route-du-week-end. Et surtout merci pour les boites de pétri, la meilleur manip de ma thèse. Allez poutou, poutou.

- Alex, merci pour toutes ces discussions passionnées autour d'une bonne bière, tous les délires hautement littéraires, ta bonne humeur et ton courage dans des moments difficiles à Rocheplane. Et oui tes deux cuisses font maintenant la même taille et t'inquiète les cicatrices ça fait guerrier, les filles adorent ;).

- Jaione, je n'oublierai pas nos cours de français sur la vitre de la hotte, ta bonne humeur et ton exubérance ont illuminé beaucoup de mes journées.

- Meriem, nous ne nous sommes pas côtoyées longtemps, mais je te remercie pour ton soutien, ton optimisme m'a beaucoup aidée dans ces derniers mois de manip.

- Steve, merci de m'avoir rappelé qu'il faut toujours faire confiance à son instinct...

Pour finir, je tiens à écrire un petit mot pour ma famille et mon compagnon.

- Merci à mes sœurs qui ont traversé la France pour venir assister à cette soutenance.

- Un grand merci ma mère qui m'a toujours soutenue dans mes études, a participé à la correction de l'orthographe de ce manuscrit sans rechigner et bien sûr a aidé à l'organisation du pot avec son efficacité habituelle.

- Merci à mon compagnon Jo, qui au cours de toutes ces années m'a toujours soutenue et encouragée malgré les obstacles et les difficultés. Merci de m'avoir permis de réaliser mon rêve de doctorat, de m'avoir une fois encore fais passer avant le reste. Aucun mot ne saurait exprimer ma reconnaissance, mon amour et mon admiration pour ce que tu es et ce que tu fais.

Sommaire

Abréviations	5
Introduction générale	11
Chapitre I : Introduction bibliographique	21
I. Modèle d'inspiration naturel : La photosynthèse	24
A. Principes généraux	24
B. La phase photochimique ou phase claire	25
C. La phase synthétique ou phase sombre	26
D. Conclusion	27
II. Modèles chimiques bioinspirés de la photosynthèse pour la photooxydation de l'eau	28
A. La photosynthèse artificielle	29
1. Principe général de la photosynthèse artificielle	29
2. Photooxydation de l'eau ; une association optimisée chromophore - catalyseur	30
B. Les complexes de ruthénium polyazotés en (photo)catalyse d'oxydation de substrats organiques	40
1. Systèmes mononucléaires	40
2. Systèmes binucléaire : les dyades	42
III. La biocatalyse	44
A. Concept général	44
B. Amélioration du biocatalyseur par ingénierie génétique – L'approche des biochimistes	46
1. Conception rationnelle : mutagenèse dirigée	46
2. Evolution dirigée	47
3. Ingénierie des voies métaboliques	49
4. Conclusions	50
C. Les métalloenzymes artificielles (ArM) – L'approche des chimistes	51
1. Design des métalloenzymes artificielles	51
2. Les photoenzymes artificielles	65
IV. Immobilisation de protéines	73
A. Immobilisation sur surface	74
1. Adsorption	74
2. Liaisons covalente	75
B. Inclusion	76
C. Réticulation	77
D. Conclusions	80

Chapitre II : Projet de thèse	81
Chapitre III : Résultats et discussions	89
I. Préparation des cristaux de Leafy	92
II. Hybride catalyseur: RuCat-Leafy	94
A. Synthèse des complexes de ruthénium RuCat	94
1. Synthèse du catalyseur Br-RuCat	95
2. Synthèse du catalyseur IA-RuCat	96
B. Etudes du greffage de IA-RuCat-Cl sur Leafy K84C	97
1. Influence de la durée d'incubation sur le taux de greffage de IA-RuCat-Cl	99
2. Quantification du ruthénium et de la protéine au sein des hybrides	100
3. Etude cinétique du greffage du IA-RuCat-Cl dans les cristaux de Leafy K84C	106
C. Caractérisation des Hybrides	111
1. Diffraction des Rayons X	111
2. Etudes spectroscopiques <i>in crystallo</i>	112
3. Spectrométrie de masse	118
D. Conclusion	125
III. Hybride chromophore: Leafy-RuPhot	127
A. Influence de la fonction d'ancrage	127
1. Greffage sur les acides glutamiques et aspartiques	128
2. Greffage sur les lysines	129
B. Influence du solvant de greffage	132
C. Influence de la concentration en NHS-RuPhot sur le taux de greffage dans les cristaux de Leafy WT	132
D. Influence de la concentration en NHS-RuPhot sur le taux de greffage dans les cristaux de Leafy K84C	135
E. Conclusions	136
Chapitre IV : Photocatalyses	137
Conclusion générale et perspectives	181
Chapitre V : Doctorat-conseil : société NMR-Bio	157
I. La société NMR-Bio	159
II. Etudes structurales des protéines par RMN	160
A. Importance du marquage spécifique des méthyles H, D, ¹³C pour l'étude de protéines par RMN	160
B. Développement des synthèses de précurseurs	163
1. Marquage stéréospécifique des méthyles de la leucine et de la valine	163

2.	Synthèse stéréosélective de la thréonine sélectivement marquée $^{13}\text{CH}_3$	173
3.	Synthèse stéréosélective de l'alanine sélectivement marquée $^{13}\text{CHD}_2$	177
III.	Conclusion	179
Partie expérimentale		181
I.	Procédures générales	183
II.	Leafy N-ter	185
A.	Production et purification	185
B.	Cristallisation	187
C.	Quantification de la protéine in crystallo par gel d'électrophorèse	187
III.	Synthèse des complexes de Ruthénium	188
A.	Synthèse IA-RuCat-Cl	188
B.	Synthèse du CIA-RuCat-Cl	191
C.	Synthèse du NH_2 -RuPhot	193
D.	Synthèse du NHS-RuPhot	194
IV.	Hybrides Leafy-Ru	196
A.	Procédure de greffage de IA-RuCat-Cl sur Leafy en solution	196
B.	Procédure de greffage sur les cristaux de Leafy	196
1.	Hybride IA-RuCat-Cl-Leafy K84C	196
2.	Hybride NHS-RuPhot-Leafy	196
3.	Hybride IA-RuCat-Cl/NHS-RuPhot-Leafy K84C	196
C.	Méthodes de caractérisation	197
1.	Spectrométrie de masse	197
2.	ICP/AES	198
3.	ICP/MS	199
4.	Spectroscopie Raman à résonance in crystallo	199
V.	Procédures générale de catalyses avec les hybrides	199
VI.	Synthèses NMR-Bio	200
A.	Synthèse stéréosélective de l'alanine deutérée $^{13}\text{CHD}_2$	200
B.	Synthèse de l'acétoacétate d'éthyle sélectivement marqué $^{13}\text{C}, \text{D}$	204
C.	Synthèse racémique de l'acétolactate sélectivement marqué $^{13}\text{C}, \text{D}$ - Procédure générale	205
1.	Alkylation - Procédure générale	205
2.	Hydroxylation - Procédure générale	207
3.	Hydrolyse - Procédure générale	209
Bibliographie		211

Abréviations

[(gp5βf)₃]₂	protéines issues du bactériophage T4
[Ru(bpy)₃]²⁺	Complexe de ruthénium trisbipyridine
6-APA	6-aminopénicillanique
A.E	Accepteur d'électrons sacrificiels
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AES	Spectrométrie d'émission atomique
ALBP	Protéine de liaison aux lipides adipocytes
ArgC	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate réductase
ArM	Métalloenzyme artificielle
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	ATP synthase
Az	<i>p</i> -azido- <i>L</i> -phénylalanine
BCAT	Branched-chain-amino-acid aminotransferase
BNAH	1-benzyl-1,4-nicotinamide
Bpy	Bipyridine
BSA	Albumine sérique bovine
BzCl	Chlorure de benzoyle
CA	Anhydrase carbonique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl₃	Chloroforme deutéré
CH₃COOH	Acide acétique
CH₃I	Iodométhane
CH₃OD	Méthanol deutéré
CLEA	Cross-Linked Enzyme Aggregates; agrégats d'enzymes réticulés
CLEC	Cross-Linked Enzyme crystals; cristaux d'enzymes réticulés
CO₂	Dioxyde de carbone

CRP	Cytochrome P450 réductase
Cyt b6f	Cytochrome b6f
Cyt P450	Cytochrome P450
CytC	Cytochrome C
D.E	Donneur d'électrons sacrificiels
D₂O	Eau deutérée
dcbpy	4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridine
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DCI	Acide chlorhydrique deutéré
DCM	Dichlorométhane
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTC	Sodium diethyldithiocarbamate
DTT	Dithiothréitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide
EDTA	Acide Ethylènediaminetétraacétique
ee	Excès énantiomérique
ESH	Electrode standard à hydrogène
Et₂O	Ether diéthylique
Et₃N	Triéthylamine
EtOH	Ethanol
FD	Ferrédoxine
FDA	Food and Drug Administration
Fe₂O₃	Oxyde de fer(III)
FNR	Ferrédoxine NADP-réductase
GDH	Glucose déshydrogénase
H₂	Hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
HEWL	Lysozyme de blanc d'œuf de poule
HHDH	Halohydrine déhalogénase
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum correlation

HNO₃	Acide nitrique
HPLC	Chromatographiques en phase liquide à haute performance
HSA	Albumine sérique humaine
I₂M	Couplage bimoléculaire de radicaux métal oxo
ICP	Plasma à couplage inductif
ISC	Conversion intersystème
K₂CO₃	Carbonate de potassium
KNO₃	Nitrate de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
KPF₆	Hexafluorophosphate de potassium
KRED	Cétoréductase
LC	Chromatographiques en phase liquide
LC	Transition centrée sur le ligand
LDA	Diisopropylamide de lithium
LiCl	Chlorure de lithium
LiHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
MC	Transition centrée sur le métal
MeOD	Méthanol deutéré
MeOH	Méthanol
Methyl-TROSY	Methyl transverse relaxation optimized spectroscopy
Milieu LB	Milieu Luria-Bertani
MLCT	Transfert de charges du métal vers le ligand
MS	Spectrométrie de masse
Na₂SO₄	Sulfate de sodium
NaBD₄	Tétrahydridoborate de sodium deutéré
NaCl	Chlorure de sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaHCO₃	Bicarbonate de sodium
NaOCl	Hypochlorite de sodium
NaOD	Soude deutérée
NaOH	Soude

NH₄Cl	Chlorure d'ammonium
NHS	N-hydroxysuccinimide
NiO	Oxyde de nickel(II)
O₂	Dioxygène
Ox	Oxydé
PAA	Acide phényl-acétique
PC	Plastocyanine
PCET	Transfert d'électron couplé à un transfert de proton
PGA	Pénicilline G acylase
Phen	Phénanthroline
PhIO	Iodosylbenzène
PQH₂	Plastoquinone
PS	Photosensibilisateur, chromophore
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
PtNPs	Nanoparticules de platine
PVA	Alcool polyvinylique
Rdt	Rendement
Réd	Réduit
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RuCat	Entité catalytique de ruthénium
RuPhot	Entité chromophore de ruthénium
SA	Sulfate d'ammonium
SEC-MALLS	Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Light Scattering
SN	Substitution nucléophile
STEM	Scanning transmission electron microscope
Ta	Température ambiante
Tampon HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Tampon Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEV	Protéase du virus de la gravure du tabac
TFA	Acide trifluoroacétique

THF	Tétrahydrofurane
TiO₂	Dioxyde de titane
TOF	TurnOver Frequency : TON par unité de temps
TON	TurnOver Number : nombre de cycle catalytique
tpy	Terpyridine
WMA	Water Nucleophilic Attack
WO₃	Trioxyde de tungstène
WOC	Catalyseur d'oxydation de l'eau

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Depuis le milieu du 19^{ème} siècle, l'industrie et en particulier l'industrie chimique s'est développée pour répondre aux besoins d'une population mondiale toujours plus nombreuse et jusqu'à récemment sans réelles préoccupations pour les conséquences environnementales. Bien que cette industrialisation massive ait permis d'augmenter la durée et la qualité de vie, elle a également, en quelques décennies, eu des conséquences néfastes en particulier sur l'environnement. En effet, outre les scandales écologiques épisodiques (le naufrage du pétrolier Amoco Cadiz, l'accident nucléaire de Tchernobyl, la catastrophe de Seveso...), l'épuisement des ressources, les changements climatiques et la disparition d'espèces aussi bien végétales qu'animales, ont entraîné une prise de conscience collective sur la nécessité d'évoluer vers un mode de vie plus respectueux de la planète.

En conséquence, les années 90 ont vu l'émergence du concept de **chimie verte**, décliné par Anastas & Warner en douze principes fondateurs (Figure 1), qui restent aujourd'hui encore d'actualité.¹ Ce concept maintenant devenu un objectif pour les chimistes en recherche fondamentale mais encore plus pour l'industrie, vise à réduire l'impact environnemental en développant des produits et des procédés chimiques intrinsèquement les moins polluants possibles et non toxiques pour les êtres vivants et l'environnement. Cette notion s'applique tout au long de la vie d'un produit chimique, de son design à son élimination en passant par sa fabrication et son utilisation.

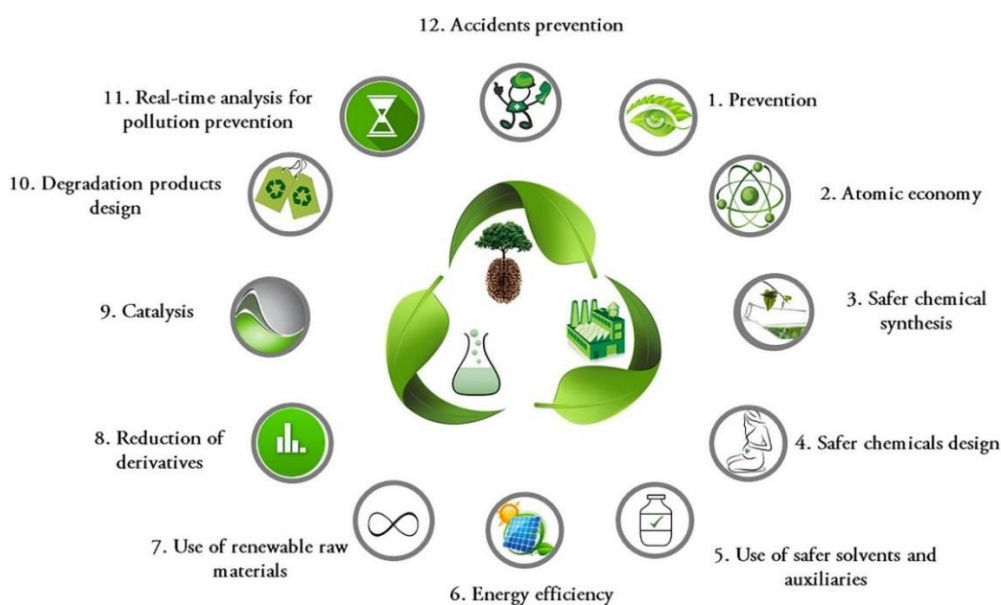


Figure 1 : Les 12 principes de la chimie verte proposés par Anastas & Warner. Reproduite de la réf²

Notre équipe porte une attention particulière à un certain nombre de ces principes comme :

- le principe 9 : utilisation de catalyseurs
- le principe 7 : utilisation de matières renouvelables
- le principe 5 : utilisation de réactifs et de solvants peu toxiques
- le principe 2 : maximiser l'économie d'atomes

Parmi les différentes réactions chimiques, les réactions d'oxydations ont été pendant très longtemps particulièrement polluantes. En effet, elles représentent 30% de la production totale de l'industrie chimique et sont traditionnellement réalisées dans des conditions dures et énergivores (pressions et températures élevées) en présence de quantités stœchiométriques d'oxydants forts et souvent toxiques tels que les sels de permanganate ou de dichromate et le tétraoxyde d'osmium dont les déchets sont particulièrement nocifs et coûteux à retraiter.³ Bien que les industriels fassent des efforts importants pour remplacer ces composés toxiques dans leurs procédés, leurs utilisations restent malheureusement toujours d'actualité dans certains systèmes lorsqu'aucune alternative rentable n'a été trouvée. C'est pourquoi les réactions d'oxydations sont de bonnes cibles pour le développement de catalyseurs plus écoresponsables.

L'utilisation de catalyseurs (Figure 1, principes 2 et 9), outre le fait qu'il s'agisse d'un des fondements de la chimie verte, présente de nombreux avantages. Tout d'abord, ils permettent d'accéder à des réactions chimiques cinétiquement trop lentes permettant par la même occasion un gain de temps et une diminution des coûts énergétiques, donc financiers. D'autre part, une très faible quantité de catalyseur peut générer une grande quantité de produits. Et dernier atout, ils peuvent être capables selon leurs natures (électroniques, structurel) d'induire certaines sélectivités (régio, chimio et stéréosélectivités) lors de la réaction.

Des efforts importants ont été portés au cours de ces dernières décennies sur le développement de catalyseurs, entraînant une généralisation de leurs utilisations. De nos jours 85% des procédés de l'industrie chimique comportent au moins une étape catalysée (Figure 2).⁴

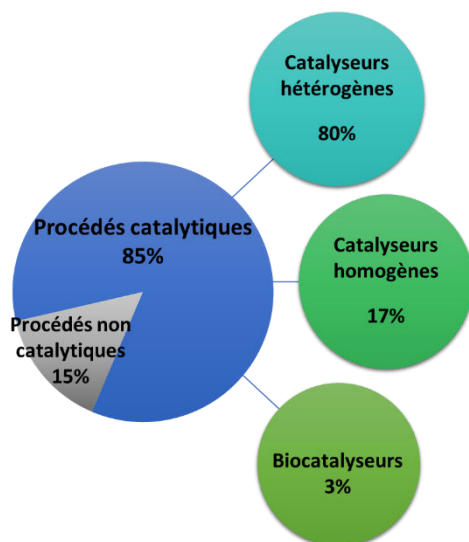


Figure 2 : Répartition de l'utilisation des procédés catalytiques dans l'industrie chimique. Inspirée de la réf⁴

Néanmoins, même si la tendance est au développement d'une chimie plus écoresponsable, il existe encore trop de catalyseurs industriels comportant encore des métaux lourds et/ou rares, et des conditions d'utilisations (pression et de température élevées) trop énergivores. On peut donner l'exemple de l'hydroformylation « procédé oxo » (catalyse homogène) pour la production d'aldéhydes à partir d'alcènes grâce à un catalyseur de rhodium, ou encore le procédé Ostwald pour la fabrication d'acide nitrique utilisant un catalyseur de platine/rhodium (catalyse hétérogène).^{5,6}

Il pourrait cependant exister des alternatives moins polluantes pour réaliser ce type de réactions par exemple en trouvant des conditions permettant l'utilisation du dioxygène ou de l'eau comme sources d'atomes d'oxygène. En effet se sont des réactifs peu toxiques, abondants, renouvelables et économiquement intéressants car peu coûteux (principes 5 et 7 Figure 1).

Enfin, ces dernières décennies ont vu la demande en composés énantiopurs fortement augmenter notamment dans les secteurs de la chimie fine (pharmaceutique, alimentaire, phytosanitaire), principalement dû au fait que 2/3 des médicaments sont des molécules présentant des centres stéréogènes et que par conséquent les deux isomères de configuration (énantiomères ou diastéréoisomères) peuvent avoir des propriétés biologiques très différentes. L'exemple le plus criant est le scandale sanitaire du thalidomide dans les

années 60. Ce médicament alors vendu en mélange racémique a entraîné de nombreuses malformations sur les fœtus. Tandis que l'un des énantiomère avait l'effet recherché d'antinauséieux pour les femmes enceintes, l'autre a eu un effet tératogène. En conséquence, les législations ont évolué conduisant, dans les années 80, la FDA (Food and Drug Administration) à imposer des tests biologiques sur chacun des isomères de configuration afin de démontrer leur activité et leur absence de toxicité.⁷ Ce durcissement de la réglementation a conduit la majorité des laboratoires pharmaceutiques à commercialiser des composés énantiopurs nécessitant de ce fait des synthèses hautement énantiosélectives et/ou le développement de moyens extrêmement efficaces de dédoublement d'énantiomères.

La plupart des catalyseurs chiraux utilisés actuellement sont des composés inorganiques constitués d'un centre métallique (des métaux de transition souvent rares pouvant d'accéder à de hauts degrés d'oxydation) et d'un ligand organique chiral responsable de l'induction asymétrique.⁸ Afin de s'affranchir de ces métaux rares, il est nécessaire d'envisager d'autres stratégies et pour y parvenir, puiser l'inspiration dans la Nature semble être une solution pertinente. En effet, la Nature, aidée par des millions d'années d'évolution a réussi à développer des systèmes particulièrement complexes et efficaces pour une action ciblée en fonction des disponibilités et de la disponibilité des matières premières.

La **Bioinspiration** prend donc la Nature comme modèle structurel et fonctionnel afin de concevoir de nouvelles technologies innovantes.⁹

Cette idée n'est pas nouvelle, puisque ce concept était déjà utilisé par Léonard de Vinci : "allez prendre vos leçons dans la nature, c'est là qu'est notre futur". Elle a depuis été utilisée de nombreuses fois avec succès et même pu être exploitée à grande échelle dans l'industrie (Figure 3). On peut prendre en exemple l'un des premiers systèmes bioinspirés industrialisés : le velcro imaginé à partir de la fleur de bardane séchée, ou encore plus récemment les panneaux photovoltaïques, inspiration directe de la photosynthèse des plantes (Figure 3).



Figure 3 : Exemples de bioinspiration

Il est indéniable que les systèmes catalytiques les plus efficaces sur Terre sont les systèmes enzymatiques. Pour accéder à un tel degré d'efficacité et de complexité, la Nature a disposé de millions d'années pour les développer, les dotant de caractéristiques qui aujourd'hui sont devenues les fondements de la chimie verte et durable (Figure 4). C'est pourquoi utiliser les enzymes comme modèle pour le développement de catalyseurs chiraux originaux semble une stratégie prometteuse.

Depuis le 20^{ème} siècle, la **biocatalyse** est employée dans l'industrie pour réaliser des réactions énantiosélectives.¹⁰ Elle a d'abord débuté par l'utilisation d'enzymes natives et de leurs substrats naturels puis grâce au progrès réalisés en matière de biotechnologie a évolué vers l'utilisation d'enzymes modifiées par mutagenèse. Ces enzymes permettent entre autres d'accéder à des réactivités non naturelles avec une efficacité pouvant être remarquable. Une évolution récente dans le domaine de la biocatalyse a conduit à associer une enzyme ou une protéine à un catalyseur métallique endogène afin d'accéder à des **métalloenzymes artificielles** présentant des réactivités inédites.¹¹ Cette partie sera développée ultérieurement dans l'introduction bibliographique.

En raison de nombreux verrous, la biocatalyse ne représente que 3% des catalyseurs industriels (Figure 2). Actuellement, il semblerait que le plus grand frein à l'utilisation de biocatalyseurs soit d'ordre psychologique. En effet, les biocatalyseurs souffrent encore aujourd'hui de leur réputation d'instabilité et de non adaptation aux conditions « classiques » de catalyse et ce malgré les nombreuses avancées technologiques dans ce domaine (immobilisation, mutagenèse dirigée...).

L'objectif de mon doctorat était le développement de nouveaux biomatériaux pour la photooxydation asymétrique de substrats organiques en utilisant l'eau comme source d'atomes d'oxygènes. Ces nouveaux catalyseurs bioinspirés ont pour but d'allier les avantages des trois modes de catalyses (Figure 4) : enzymatique (sélectivité et efficacité), homogène (modularité) et hétérogène (stabilité et recyclabilité : principe 2 Figure 1).

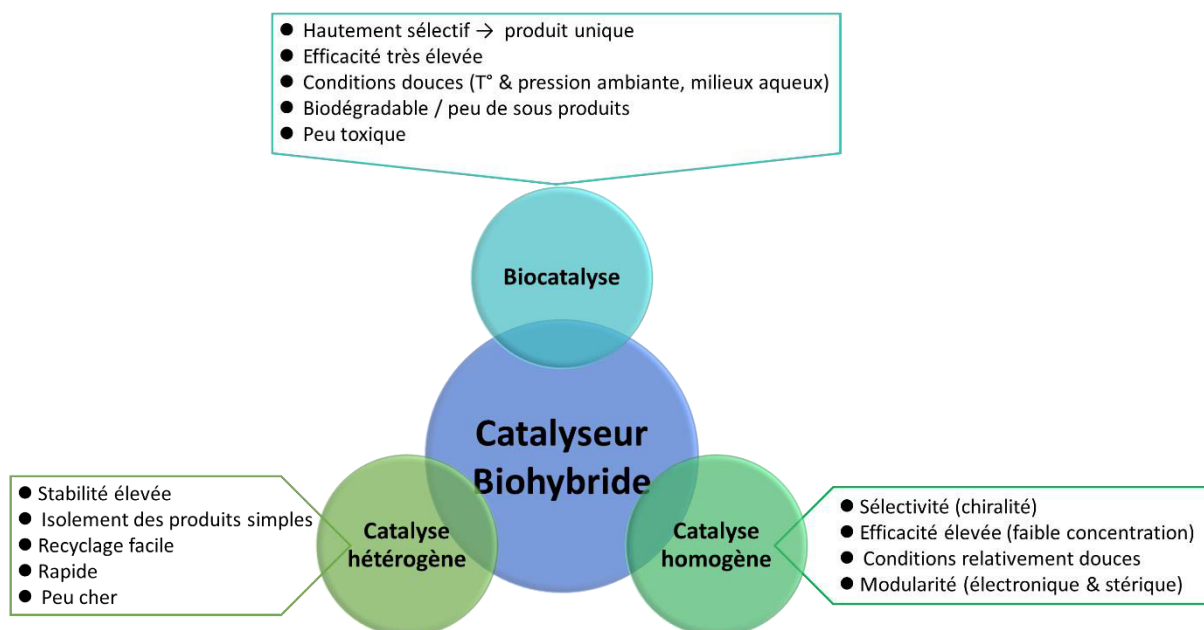


Figure 4 : Catalyseur biohybride : le meilleur des trois mondes ?

En parallèle de mon sujet de thèse, à hauteur de 16% de mon temps, j'ai également effectué un travail de **doctorat-conseil** auprès de la société grenobloise NMR-Bio. Ceci fera l'objet d'un chapitre de ce manuscrit.

Ce manuscrit comprendra donc cinq chapitres : L'introduction bibliographique exposera le concept de photocatalyse avec un rapide rappel sur la photosynthèse, puis présentera les catalyseurs et photosensibilisateurs utilisés pour la photocatalyse d'oxydation. Dans une seconde partie, sera introduit le concept de biocatalyse, un état de l'art sur la conception des métalloenzymes artificielles et une présentation des différentes techniques d'immobilisation d'enzymes.

Le second chapitre sera consacré à une présentation détaillée du projet de recherche.

Le troisième chapitre présentera d'une part la conception des matériaux biohybrides développés au cours de cette thèse mais aussi leurs caractérisations par différentes techniques spectroscopiques.

Le quatrième chapitre exposera les résultats de photocatalyses préliminaires obtenues sur les différents hybrides.

Le cinquième et dernier chapitre présentera les travaux de recherches effectués pour la société NMR-Bio, spécialisée dans la conception et la production d'acides aminés et de précurseurs métaboliques d'acides aminés marqués (^1H , ^2H , ^{12}C , ^{13}C). Cette société propose

également des services pour l'étude structurale et dynamique des protéines par RMN. Dans ce chapitre, une première partie sera consacrée à un bref historique de la société suivie de la description de mes deux projets de recherche :

i) le développement d'une synthèse de marquage dissymétrique de l'acétoacétate, en vue d'obtenir de nouvelles formes de marquages sur les acides aminés cibles (leucine, valine).

ii) le développement de la synthèse de l'alanine sélectivement marquée sur le groupement méthyle.

CHAPITRE I

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Introduction Bibliographique

L'eau est abondamment présente sur Terre. Plus de 70% de la surface terrestre en est recouverte. De prime abord, il semble s'agir d'une molécule simple et sans intérêt mais en réalité ses propriétés tout à fait spécifiques la rendent indispensable à la vie. Effectivement, l'eau est considérée comme le solvant universel en biologie puisqu'elle assure et permet de nombreuses fonctions du métabolisme. Elle participe entre autres à la dissolution et au transport des éléments nécessaires à la vie (nutriments, minéraux, métaux, gaz). Elle a aussi un rôle de structuration notamment au niveau des macromolécules biologiques (protéines, ADN...) et de régulation thermique. Il n'est donc pas anodin que la vie soit apparue en premier lieu dans le milieu aquatique. Si l'eau revêt une telle importance dans les processus biologiques, il paraît indispensable que les chimistes s'attachent à l'étudier et à l'utiliser surtout dans un contexte de bioinspiration; et ceci d'autant plus qu'elle possède de nombreuses qualités répondant aux critères de la chimie verte : l'eau est peu toxique, très abondante et pourrait ainsi être utilisée comme une source peu onéreuse d'atomes d'oxygène et de protons, ou encore d'énergie. De plus, certains des produits générés (comme par exemple O_2 , H_2) sont également dépourvus de toxicité.

Parmi les réactions impliquant la molécule d'eau, son oxydation en dioxygène est cinétiquement et thermodynamiquement défavorable. Cependant, la Nature est capable de la réaliser. Au cours des 2-3 milliards d'années qui ont été nécessaires au développement de la vie sur Terre telle que nous la connaissons, un système très efficace a été développé pour convertir l'eau, le dioxyde de carbone et la lumière du soleil en énergie utilisable dans le seul but d'alimenter les machineries du vivant : **La photosynthèse.**

I. Modèle d'inspiration naturel : La photosynthèse

A. Principes généraux

Grâce à la photosynthèse (Figure I.1), les plantes supérieures utilisent la lumière du soleil comme source d'énergie pour convertir le dioxyde de carbone atmosphérique et l'eau en nutriment pour la plante (glucose et O₂).

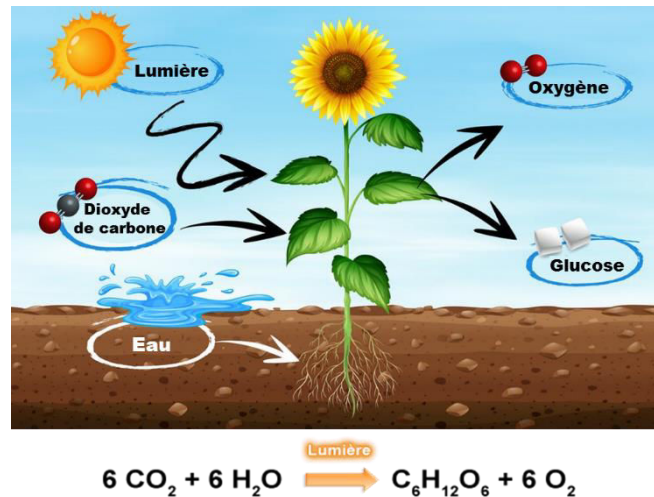


Figure I.1 : Représentation schématique de la photosynthèse des plantes supérieures.

Ce processus est primordial pour la vie terrestre. En effet c'est grâce à l'oxygène produit (qui fut responsable de la première grande pollution atmosphérique) que la vie sous sa forme actuelle a pu apparaître sur Terre. Mais c'est aussi le seul système naturel capable d'utiliser l'énergie lumineuse pour produire de la matière organique, fournissant ainsi l'essentiel de la biomasse et de l'énergie de l'écosystème terrestre. Plus précisément, la photosynthèse est une voie biochimique extrêmement complexe se déroulant au sein des chloroplastes et implique deux phases successives (Figure I.2) :

i) La phase photochimique (ou phase claire)

Il s'agit essentiellement d'un processus de conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. C'est au cours de cette phase que l'eau est utilisée en tant que source d'électrons et de protons (photolyse de l'eau) conduisant à la production d'O₂ : $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2$

ii) La phase synthétique (phase sombre)

Cette phase est dite « sombre » car l'énergie lumineuse n'est pas directement impliquée. C'est une étape de biosynthèse des glucides à partir du CO₂ atmosphérique.

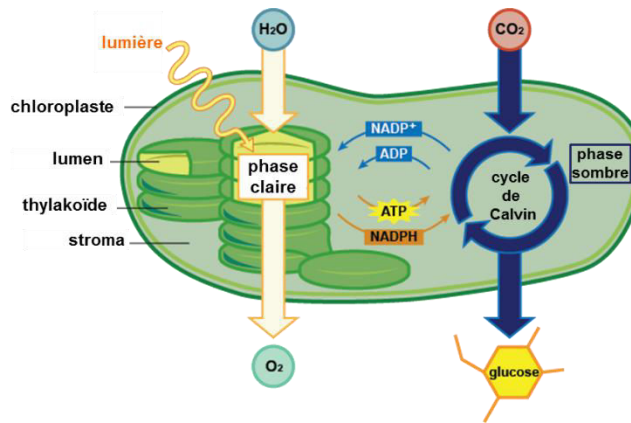


Figure I.2 : Représentation schématique des deux phases de la photosynthèse.

B. La phase photochimique ou phase claire

La première étape de la photosynthèse est un processus extrêmement complexe qui implique quatre complexes protéiques imposants localisés dans la membrane du thylakoïde (Figure I.3). Au cours de cette étape, l'énergie lumineuse absorbée par les deux photosystèmes (PSI et PSII) est convertie en ATP (énergie chimique) et en NADPH (énergie réductrice).

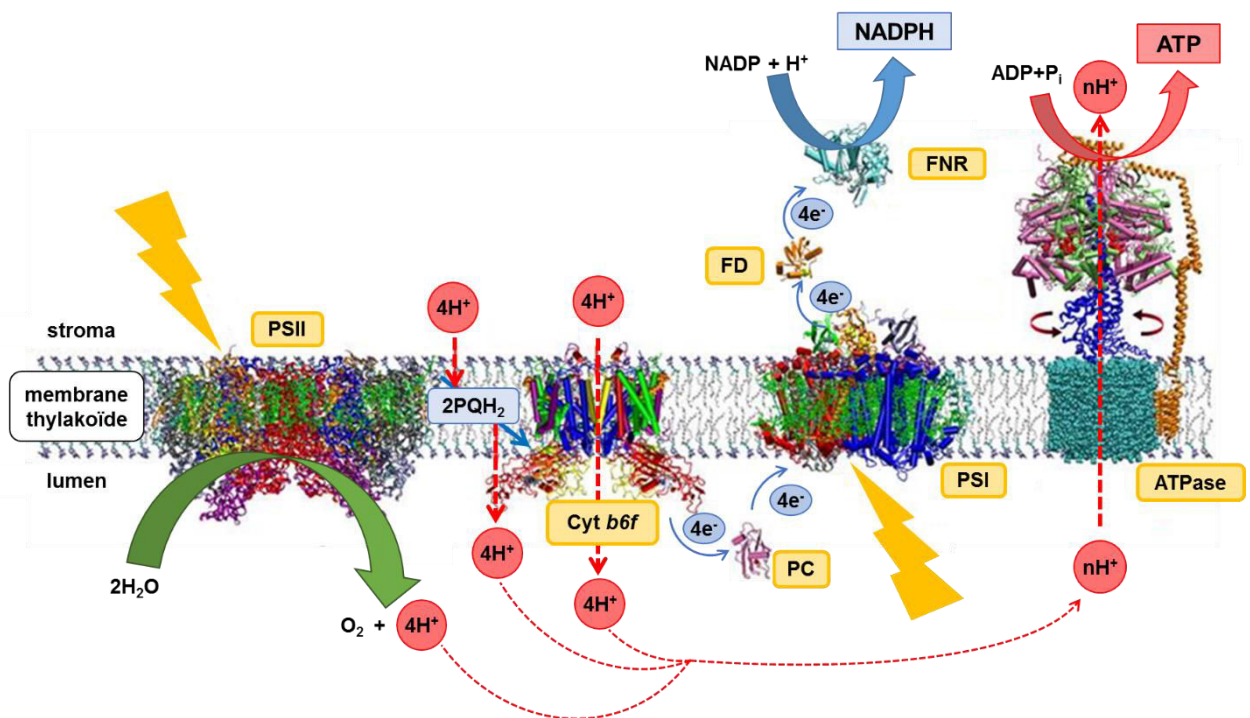


Figure I.3 : Membrane thylakoïde avec les principaux complexes protéiques (les photosystèmes I et II, le cytochrome b6f et l'ATP synthase).¹²

Les deux photosystèmes ont pour rôle la conversion de l'énergie des photons absorbés en un flux d'électrons. Les électrons générés lors de l'oxydation de l'eau suite à la photoexcitation du cytochrome P680 localisée dans le PSII sont transportés par une chaîne de complexes protéiques et de porteurs mobiles constituant la chaîne de transport d'électrons (Figure I.3, voie bleue) : plastoquinone (PQH₂), cytochrome b6f (cyt b6f), plastocyanine (PC), PSI, ferrédoxine (FD) jusqu'à la ferrédoxine NADP-réductase (FNR) afin de réduire le NADP⁺ en NADPH.^{12,13}

En parallèle, les protons nécessaires au processus sont transférés grâce à un gradient jusqu'à l'ATP-synthase lui fournissant l'énergie nécessaire à la conversion de l'ADP en ATP (Figure I.3, voie rouge).

Cependant la réaction qui depuis des décennies suscite l'intérêt parmi les chimistes se produit au niveau du PSII. Il s'agit de la **photolyse de l'eau**. En effet, le transfert de l'électron généré après irradiation du cytochrome P680 initie une séparation de charge induisant la formation d'un superoxydant P680⁺ capable d'oxyder le centre réactif du PSII appelé complexe d'oxydation de l'eau.¹⁴ Il s'agit d'un cluster métallique composé de quatre atomes de manganèse et d'un atome de calcium capable d'accumuler un à un quatre équivalents oxydant provenant de l'oxydation de deux molécules d'eau en dioxygène.^{15,16} Ce système a été et reste extrêmement étudié en raison de sa complexité et de son originalité qui peuvent être source d'inspiration pour la conversion et le stockage de l'énergie solaire.

C. La phase synthétique ou phase sombre

La seconde phase de la photosynthèse ne nécessite pas d'activation lumineuse. Les produits issus de la phase photosynthétique (le NADPH qui est un agent réducteur et l'ATP qui est une source d'énergie) sont utilisés afin de réduire le CO₂ pour la conversion en glucides (C_nO_nH_{2n}) dans le cycle de Calvin et ainsi produire la biomasse des plantes.¹⁷

D. Conclusion

La photosynthèse est le seul système naturel capable de réaliser l'oxydation photochimique de l'eau pour l'utiliser comme source d'électrons et de protons en générant O_2 comme sous-produit. En observant le processus de photolyse de plus près, trois partenaires sont indispensables à son bon fonctionnement (Figure I.4) :

- Un accepteur d'électrons
- Un chromophore (ou photosensibilisateur)
- Un catalyseur

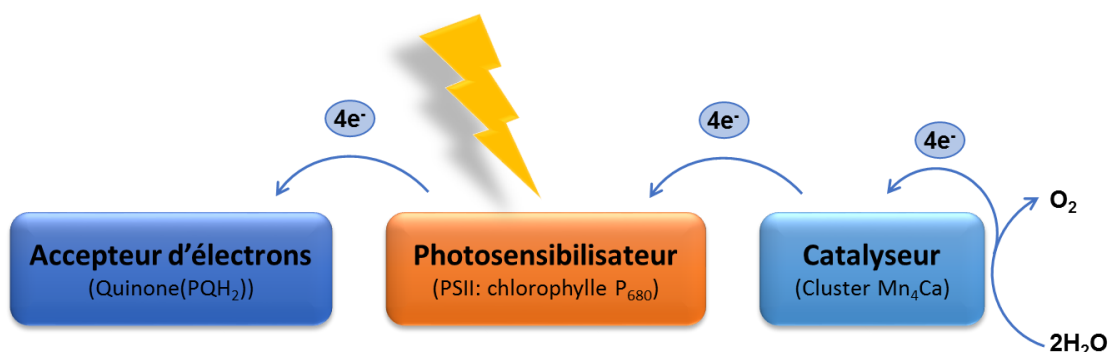


Figure I.4 : Schéma de principe de la photooxydation de l'eau.

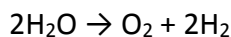
Dans l'optique de s'inspirer du système photosynthétique pour convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique et ainsi pourvoir aux besoins énergétiques toujours grandissants de la société, elle-même grandissante, il est nécessaire de trouver un équivalent chimique à chacune des entités biologiques impliquées dans la photosynthèse. C'est dans ce contexte qu'est né un domaine de recherche d'importance en chimie : **la photosynthèse artificielle** et son corollaire, le développement de combustibles solaires («solar fuel»).

II. Modèles chimiques bioinspirés de la photosynthèse pour la photooxydation de l'eau

Actuellement, environ 80 % de la consommation mondiale d'énergie est basée sur l'utilisation de combustibles fossiles, (charbon, pétrole et gaz naturel). Cependant, alors que ceux-ci sont des produits dérivés de la biomasse donc de la photosynthèse, ironie du sort, ceux-ci sont les principales causes de pollutions environnementales et du réchauffement planétaire actuel.¹⁸ C'est pourquoi, il y a urgence à développer des énergies alternatives propres, renouvelables, respectueuses de l'environnement et neutres en carbone.

Le soleil fournit chaque heure à notre planète plus d'énergie que la consommation annuelle de l'humanité. Etant donné que la Nature avec la photosynthèse réalise la conversion d'énergie lumineuse en énergie chimique, s'en inspirer est donc une idée séduisante pour concevoir des systèmes moléculaires synthétiques mimant cette fonction.

Compte tenu de la nature intermittente de l'énergie solaire, la conversion de cette énergie en énergie chimique qui pourrait être plus facilement stockable en combustible est une option qui reste intéressante. Ainsi l'utilisation de l'énergie solaire pour convertir l'eau en combustibles solaires, comme le dihydrogène (H₂) est un domaine particulièrement étudié.



A première vue, cette transformation semble aisée en raison de la simplicité structurale aussi bien de l'eau que des produits formés. Cependant, elle se compose de deux demi-réactions d'oxydoréduction :

i) la réduction des protons en dihydrogène : $4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2$ ($E^\circ = 0,0 \text{ V vs ESH}$: Electrode Standard à Hydrogène)

ii) l'oxydation de l'eau en dioxygène : $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2$ ($E^\circ = +1,23 \text{ V vs ESH}$)

C'est en réalité cette dernière réaction qui présente le plus de difficultés car elle implique le transfert de quatre électrons, le réarrangement de multiples liaisons, et finalement la formation de la liaison O-O, se traduisant par un ΔG élevé ($\sim 237 \text{ kJ.mol}^{-1}$) et une barrière d'activation qui l'est tout autant ($E^\circ = +1,23 \text{ V vs ESH}$). Cette réaction n'étant pas thermodynamiquement et cinétiquement favorable, il est nécessaire d'utiliser un catalyseur.¹⁹

A. La photosynthèse artificielle

1. Principe général de la photosynthèse artificielle

En utilisant la Nature comme modèle, un système photosynthétique artificiel (Figure I.5) se compose, à l'anode de l'association d'un chromophore (PS) avec un catalyseur d'oxydation de l'eau (Cat_{Ox}) inspiré de la paire P680/cluster Mn_4Ca et de l'autre côté, à la cathode, d'un catalyseur de réduction de protons ($\text{Cat}_{\text{Réd}}$) utilisant les électrons libérés lors de la réaction d'oxydation anodique.²⁰

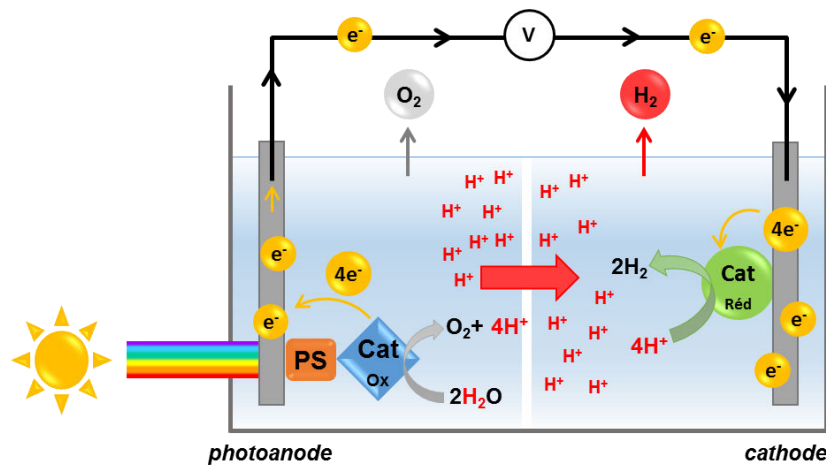


Figure I.5 : Schéma d'un dispositif de photosynthèse artificielle (cellule photoélectrochimique).

La Figure I.5 montre au-delà de la simple réaction $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2$, toute la complexité d'un tel système. Au niveau de la photoanode, la séparation de charge (paire électron-trou) photoinduite au niveau du chromophore va permettre d'une part la réduction cathodique des protons grâce aux électrons issus du chromophore excité, et d'autre part, le trou généré au niveau du chromophore sera comblé par les électrons issus de l'oxydation anodique de l'eau.²¹

2. Photooxydation de l'eau ; une association optimisée chromophore - catalyseur

Concernant cette réaction et notamment le développement de la photoanode, la littérature est particulièrement abondante.^{18,22} Cependant deux approches principales semblent se dégager selon la nature du photosensibilisateur :

i) Ils peuvent être des semi-conducteurs tels que l'oxyde de nickel(II) (NiO), le dioxyde de titane (TiO₂) ou plus récemment le trioxyde de tungstène (WO₃) et l'oxyde de fer(III) (Fe₂O₃).¹⁸ Ils jouent alors à la fois un rôle de générateur de séparation de charges et de transporteur de charges.

ii) Ils peuvent aussi être des complexes. Ils sont généralement greffés sur des semi-conducteurs et permettent la séparation de charges suite à l'absorption lumineuse. Le prototype étant le complexe de ruthénium trisbipyridine ([Ru(bpy)₃]²⁺).

a) Le photosensibilisateur

La plupart des chromophores moléculaires utilisés répondent à un certain nombre d'exigences telles que :

i) Il est préférable qu'ils absorbent dans le visible. Puisque 40% de la lumière solaire est émise dans le spectre visible contre seulement 5% pour les UV.

ii) L'espèce obtenue après irradiation que ce soit directement sous sa forme excitée ou indirectement sous sa forme oxydée doit être en mesure d'oxyder le partenaire catalytique.

iii) Il est important que ces complexes possèdent une bonne photostabilité.

iv) Pour finir, une modulation aisée des propriétés photophysiques par modification chimique est un atout considérable.

Le chromophore de référence répondant sans nul doute à tous ces critères est le complexe de ruthénium trisbipyridine ([Ru(bpy)₃]²⁺), ce qui explique son utilisation particulièrement abondante.^{16,21,23-27} Ses propriétés photophysiques et électrochimiques exceptionnelles expliquent l'engouement des chercheurs à son égard.

Un prototype : $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ - propriétés spectroscopiques

Le spectre d'absorption UV-Visible du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ est composé de quatre bandes principales (Figure I.6). Les bandes à 244 nm et 287 nm correspondent aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ centrées sur le ligand (LC). L'épaule à 322 nm est associée à des transitions $d_M \rightarrow \pi_M^*$ centrées sur le métal (MC). Enfin la bande d'absorption relativement large aux alentours de 450 nm dans la partie visible du spectre correspond quant à elle à un transfert de charges du métal vers le ligand $d_M \rightarrow \pi_L^*$ (MLCT) permises de spin.²⁸

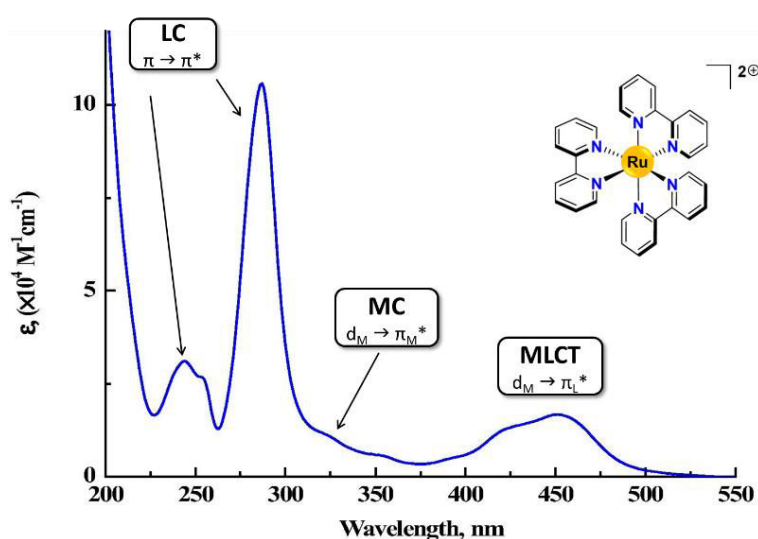


Figure I.6 : Spectre d'absorption du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ dans CH_3CN à 298K. Reproduit de la réf²⁸

Ainsi, l'excitation lumineuse à 450 nm conduit à un état excité $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bpy})_2(\text{bpy}^{\bullet-})]^{2+}$ dans lequel un électron de l'orbitale t_{2g} du métal a été excité vers une orbitale π^* du ligand. L'absorption d'un photon conduit donc à une séparation de charge (paire électron trou) où le métal a été oxydé et le ligand réduit. Cet état excité singulet couramment noté $^1[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$ subit très rapidement (durée de vie d'environ 100 fs) une conversion intersystème (ISC) conduisant à un état triplet, $^3[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+*}$ (Figure I.7). Ce dernier grâce à un temps de vie relativement long d'environ 800ns confère au complexe de ruthénium des propriétés photochimiques particulièrement intéressantes qui justifient son utilisation abondante.

La stabilité de cet état triplet s'explique par la transition vers l'état fondamental qui est interdite de spin induisant un temps de retour à l'état fondamental de l'ordre de la milliseconde par une désexcitation non radiative.²¹ Néanmoins, grâce à cette durée de vie relativement longue de l'état excité, un certain nombre de réactions biomoléculaires deviennent possibles.

Un prototype : $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ - propriétés d'oxydoréductions

Tout d'abord, il est évident qu'il devient plus facile d'arracher l'électron de l'orbitale π^* qu'un électron localisé dans l'orbitale t_{2g} de l'état fondamental. Il en résulte que l'état excité est plus facilement oxydable que l'état fondamental (Figure I.7). Ensuite, de la même manière, il devient plus simple de réduire l'état excité que l'état fondamental en injectant un électron dans la basse vacante t_{2g} de l'état excité au lieu de la basse vacante π^* de l'état fondamental (Figure I.7).

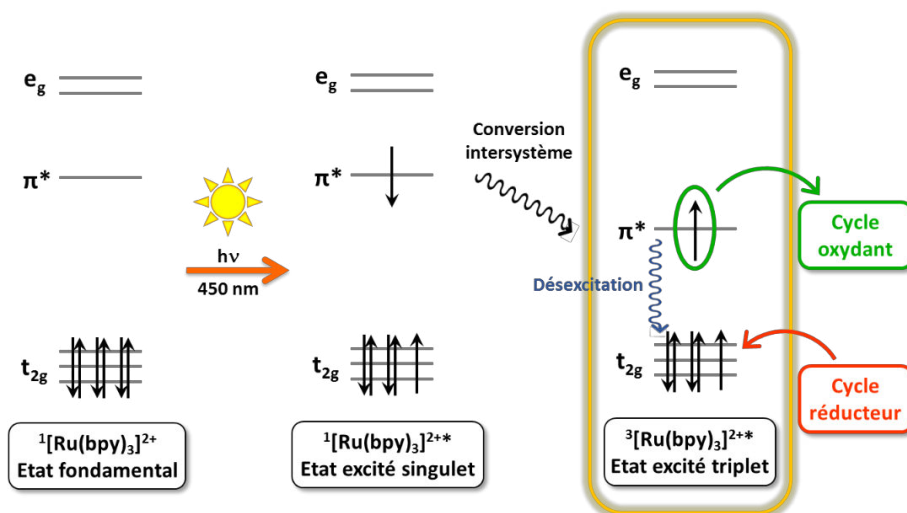


Figure I.7 : Représentation simplifiée du peuplement des orbitales moléculaires du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ dans son état fondamental et dans ses états excités.

Par conséquent, l'état excité est à la fois plus facilement oxydable et réductible que l'état fondamental. Ceci se traduit d'une part par des potentiels d'oxydation et de réduction respectivement plus bas ($-0,81 \text{ V vs ESH}$) et plus haut ($+0,77 \text{ V vs ESH}$) que dans l'état fondamental (respectivement $+1,26 \text{ V}$ et $-1,33 \text{ V vs ESH}$) (Figure I.8).²⁹ Il est également important de noter que l'oxydation ou la réduction de cet état excité conduit respectivement à des espèces $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ et $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^+$ particulièrement oxydante et réductrice. (Figure I.9).

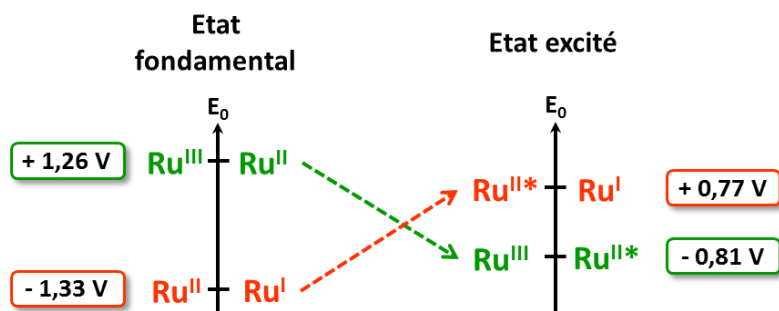


Figure I.8 : Modifications des propriétés d'oxydoréduction du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ induites par l'absorption de photons (potentiels donnés vs ESH).

Enfin, il a été montré que l'état excité était également en mesure de revenir à l'état fondamental en transférant son énergie à un accepteur d'énergie (comme par exemple $^3\text{O}_2$).²⁶

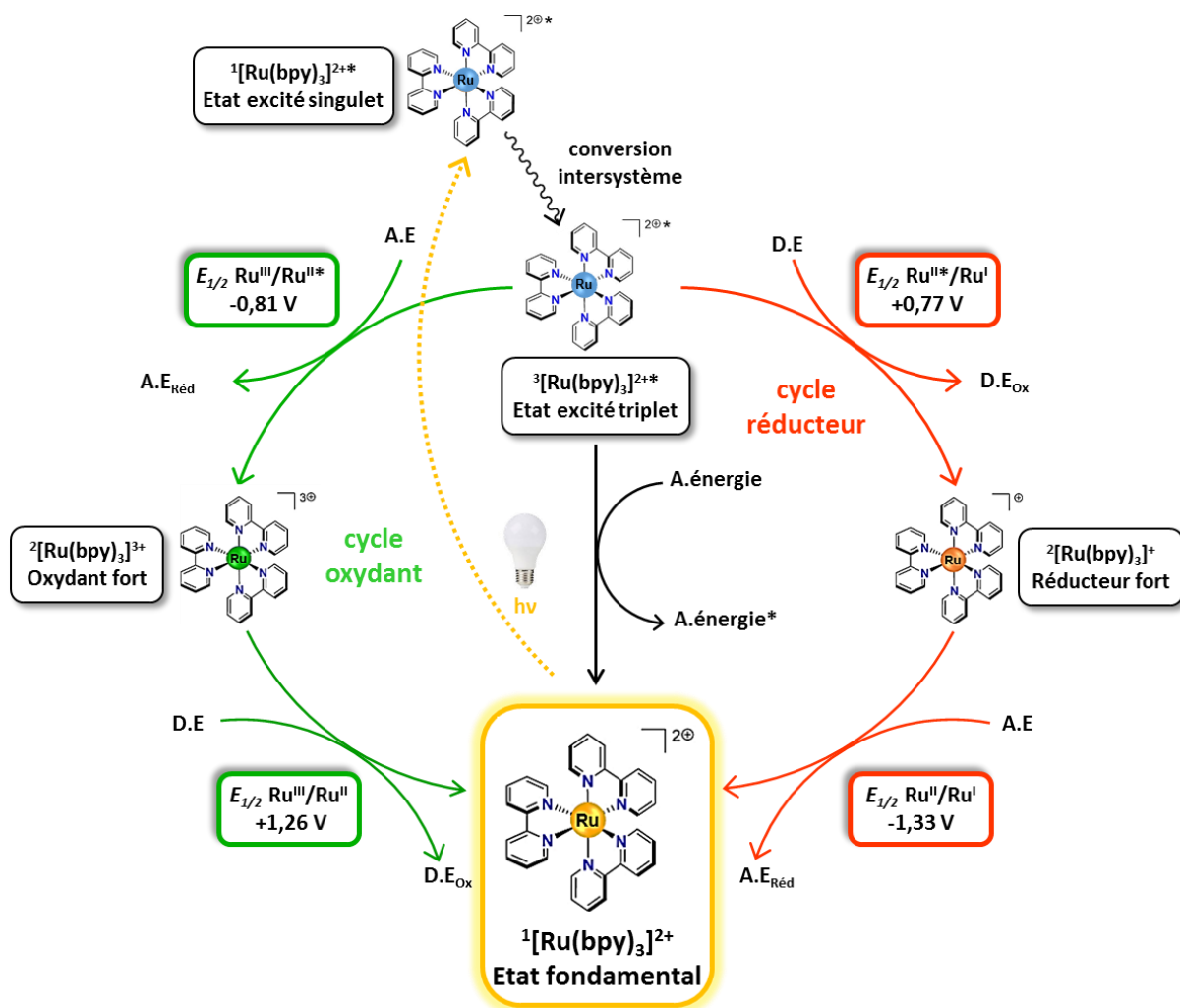


Figure I.9 : Propriété RédoX de l'état triplet du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Potentiels donnés vs ESH. Accepteur d'électrons (A.E), Donneur d'électrons (D.E)

Grace à ses propriétés intrinsèques exceptionnelles résumées dans la Figure I. 10, le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ s'avère être un chromophore de choix pour le développement de réactions photocatalytiques.

En effet, il répond à tous les critères d'un bon photosensibilisateur :

- i) Une large bande d'absorption dans le visible.
- ii) Une durée de vie de l'état excité relativement longue permettant des réactions bimoléculaires.
- iii) Il est également possible de modifier assez facilement les ligands bipyridines en introduisant différents groupements pour modifier ses propriétés photophysiques ou pour permettre son ancrage sur une surface spécifique.

iv) Il présente également une bonne photostabilité permettant des temps d'irradiation longs mais aussi une bonne chimiostabilité. Il est en effet relativement robuste et capable de fonctionner avec des conditions expérimentales très variées telles que la présence d'eau et de solvants organiques mais aussi des conditions de pH très acides parfois nécessaires aux catalyseurs d'oxydation de l'eau.²⁶

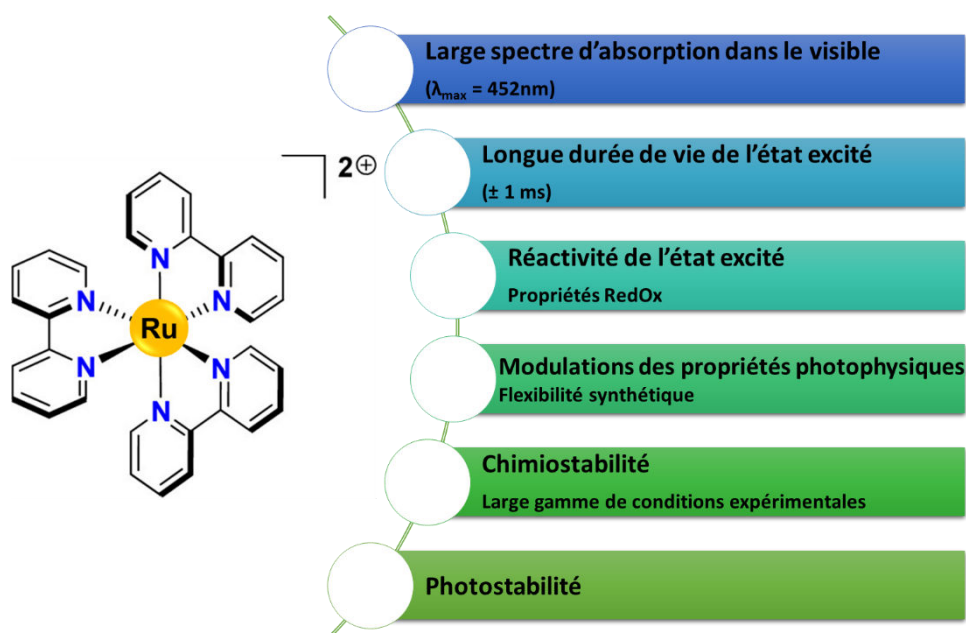


Figure I. 10 : Le $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$: toutes les qualités d'un bon photosensibilisateur.

b) Catalyseurs d'oxydation de l'eau

En général, les catalyseurs moléculaires d'oxydation de l'eau (souvent notés WOC pour Water Oxidation Catalyst) sont des complexes à base de métaux redox-actifs ayant une première sphère de coordination insaturée et capables de former un intermédiaire métal-oxo permettant l'oxydation de l'eau.

Historiquement les premiers complexes ayant été décrits pour l'oxydation de l'eau sont des complexes de ruthénium (Figure I.11) avec le fameux « Blue-dimer » décrit par Meyer en 1982.³⁰ Bien que son activité soit limitée (13 TON) (TurnOver Number : nombre de cycle catalytique = nombre de moles de produit obtenu par mole de catalyseur), ce complexe en montrant sa capacité à oxyder l'eau a ouvert la voie au développement de nombreux complexes binucléaires de ruthénium présentant des efficacités très variables en fonction des ligands utilisés.

En raison du transfert de quatre électrons et de quatre protons nécessaires à l'oxydation de l'eau, il était communément admis que les catalyseurs d'oxydation de l'eau devaient comporter au minimum deux centres métalliques agissant de concert. Néanmoins plus de vingt ans après le « blue dimer », l'équipe de Thummel a décrit le premier complexe mononucléaire de ruthénium (Figure I.11) capable d'oxyder la molécule d'eau. Ce résultat a ouvert de ce fait la voie à une série de nouveaux complexes mononucléaires présentant de très bonnes activités allant jusqu'à plus de 55000 TON pour les complexes de dernière génération (Figure I.11).

Il est toutefois à noter que les TON et les TOF (TurnOver Frequency : TON par unité de temps) dépendent grandement des conditions expérimentales rendant difficiles voire impossible les comparaisons entre les différents systèmes.

Par exemple, le choix de l'oxydant utilisé a une forte influence sur l'efficacité du système. L'oxydant chimique de référence est le Ce^{IV} issu du nitrate de cérium et d'ammonium (CAN). Cet oxydant présente plusieurs avantages. Tout d'abord, son potentiel élevé ($E_{\frac{1}{2}} \text{Ce}^{\text{IV}} / \text{Ce}^{\text{III}} = +1,61 \text{ V vs ESH}$) lui permet l'oxydation d'un grand nombre de complexes à des hauts degrés d'oxydation. Ensuite, il est soluble dans l'eau ce qui facilite son utilisation en milieux aqueux requis pour l'oxydation de l'eau. Cependant, il présente un inconvénient majeur lié à un pH d'utilisation très acide (pH = 1) nécessitant des catalyseurs robustes. Le Ce^{IV} semble donc être le premier oxydant utilisé d'une part pour réaliser une preuve de concept sur l'efficacité d'un système et d'autre part pour des études mécanistiques. Par la suite, la plupart des chercheurs ont pu le remplacer par des oxydants « plus propres », tels que les photooxydants (association d'un chromophore et d'un accepteur d'électrons), ou en réalisant des oxydations électrocatalytiques ou photoélectrocatalytiques.

Il reste néanmoins regrettable qu'aucune condition standard n'ait pu être définie afin de pouvoir comparer rigoureusement et facilement les différents systèmes entre eux.

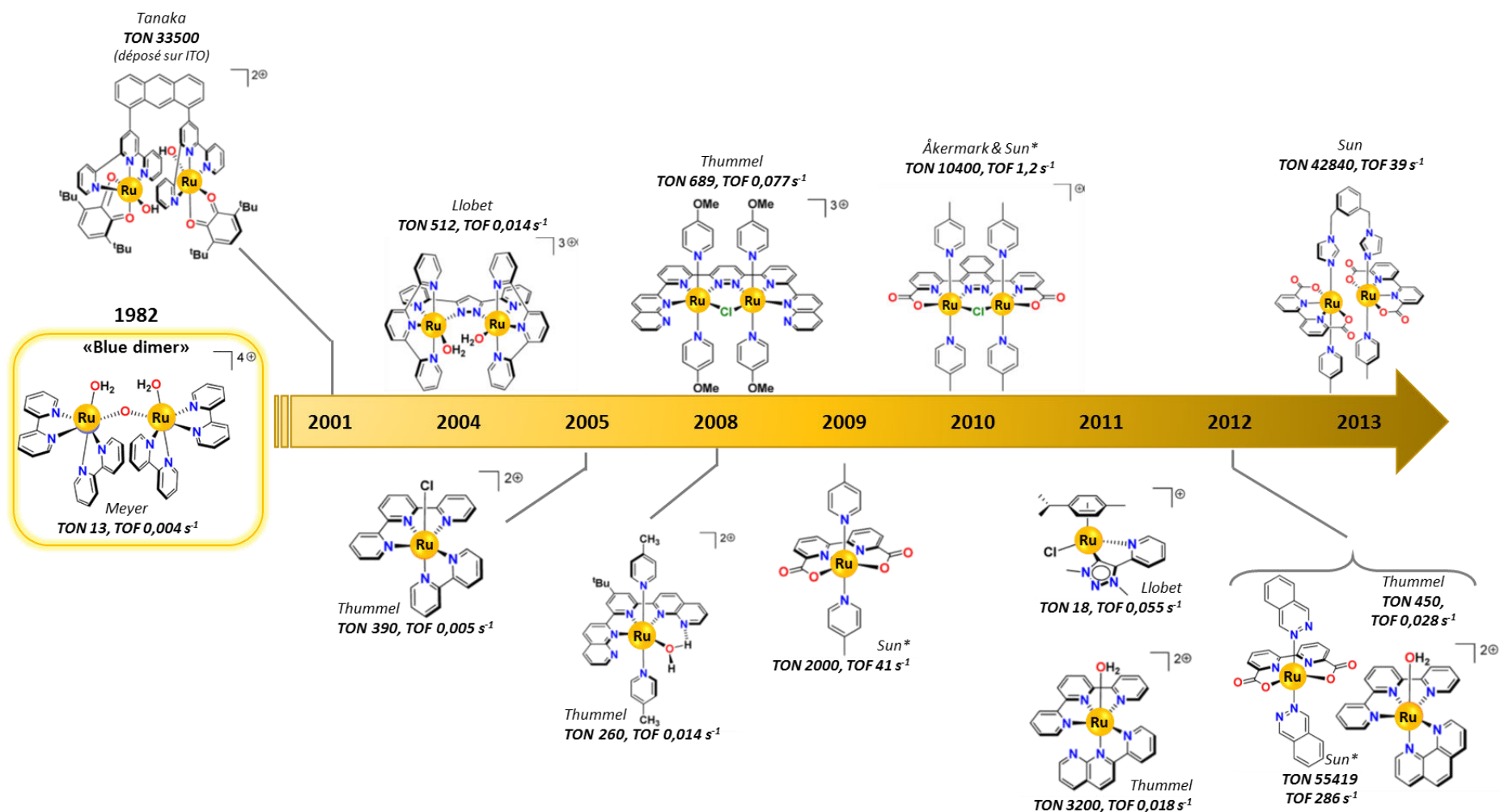


Figure I.11 : Sélection d'exemples de complexes de Ruthénium capables d'oxyder l'eau et évolution de leurs développements. Tous les exemples utilisent le Ce^{IV} (Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ - CAN) comme oxydant chimique. (*) Complexes ayant aussi été testés avec un oxydant photochimique mais avec de moins bons résultats.

En parallèle des complexes de ruthénium, s'est également développé une série de complexes d'iridium (Figure I.12) qui présentent de très bonnes efficacités en raison de leurs propriétés photochimiques et redox proches du $[Ru(bpy)_3]^{2+}$.²¹ Néanmoins, la rareté du métal ainsi que la très faible solubilité des complexes en milieu aqueux ont limité l'intérêt porté à ces complexes.

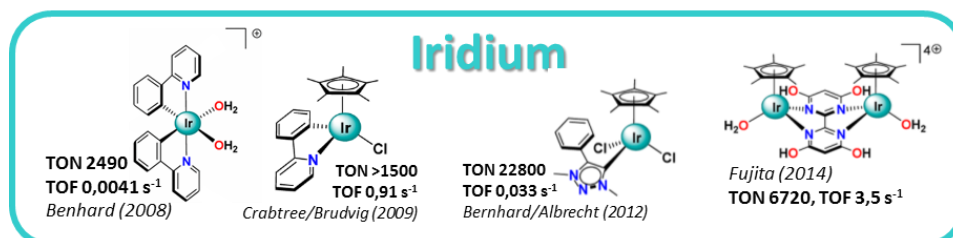


Figure I.12 : Exemples de complexes d'iridium utilisés pour l'oxydation de l'eau.^{18,21}

Sous la pression de la chimie verte, des complexes utilisant des métaux de transition de la première série, tels que le manganèse, le fer, le cobalt, ou encore le cuivre ont été développés (Figure I.13).³¹ Cet intérêt, relativement récent, vient du fait que ces métaux sont très abondants sur Terre, peu toxiques et peu coûteux. Néanmoins, malgré des efficacités non négligeables, il reste encore beaucoup de travail pour égaler les complexes de ruthénium qui demeurent la référence actuelle.

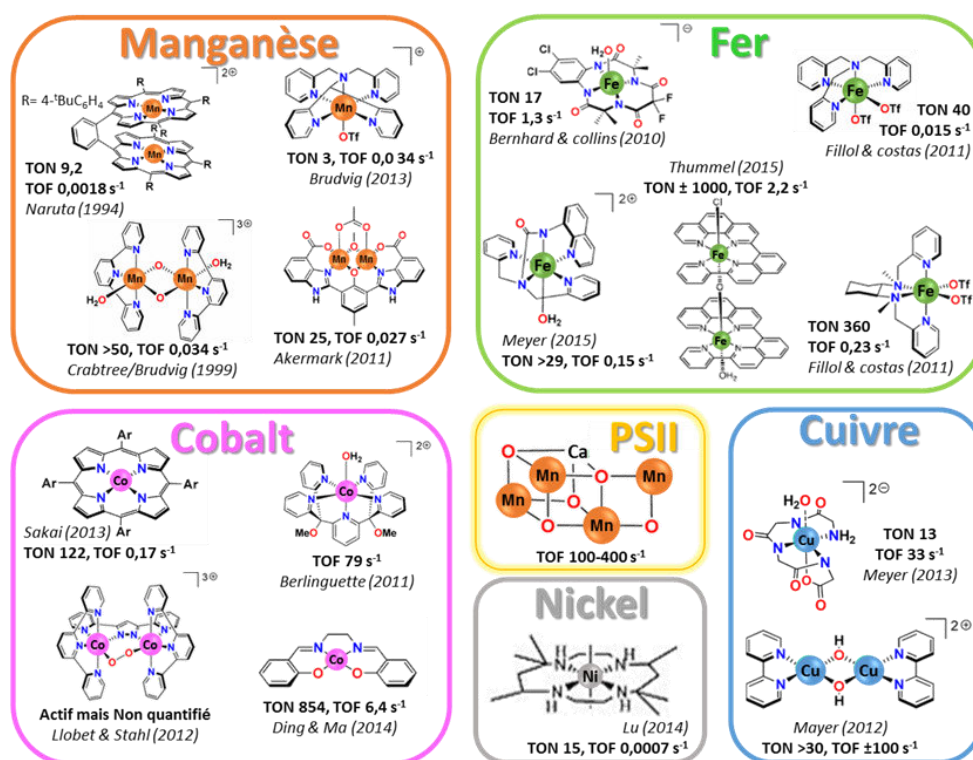


Figure I.13 : Exemples de catalyseurs pour l'oxydation de l'eau utilisant des métaux abondants sur Terre. Inspirée des réf^{18,31}

c) Mécanisme d'oxydation de l'eau

Afin de mieux comprendre le fonctionnement des WOC, des études mécanistiques ont été réalisées. Le « blue dimer » a été utilisé comme modèle et grâce aux études électrochimiques, spectroscopiques et cinétiques menées, a largement contribué à l'élucidation du mécanisme catalytique de ces systèmes. Ainsi, deux mécanismes catalytiques ont pu être proposés et implique soit une attaque nucléophile de l'eau (WNA Water Nucleophilic Attack) soit un couplage bimoléculaire de radicaux métal oxo (I2M) (Figure I.14).

Les deux mécanismes débutent par la formation d'un complexe métal-aquo ($M-OH_2$). La perte de deux électrons couplée à la perte de deux protons conduit à une espèce métal-oxo ($M=O$). Celle-ci peut subir l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau (mécanisme WNA) conduisant à une espèce hydroperoxo ($M-OOH$) *via* la formation de la liaison O-O. Son oxydation ultérieure libère O_2 et régénère le catalyseur. Ou alors, deux espèces métal-oxo réagissent entre elles *via* un processus radicalaire (mécanisme I2M) conduisant à la formation de la liaison O-O puis à la libération du dioxygène. Dans ce dernier mécanisme, dans le cas d'un catalyseur binucléaire la réaction est intramoléculaire, alors que dans le cas d'un catalyseur mononucléaire, il s'agit d'une interaction intermoléculaire entre deux entités catalytiques. Dans un cas comme dans l'autre, un intermédiaire μ -peroxo est produit ($M-O-O-M$) qui libère le dioxygène après une dernière oxydation.^{18,21,22,32}

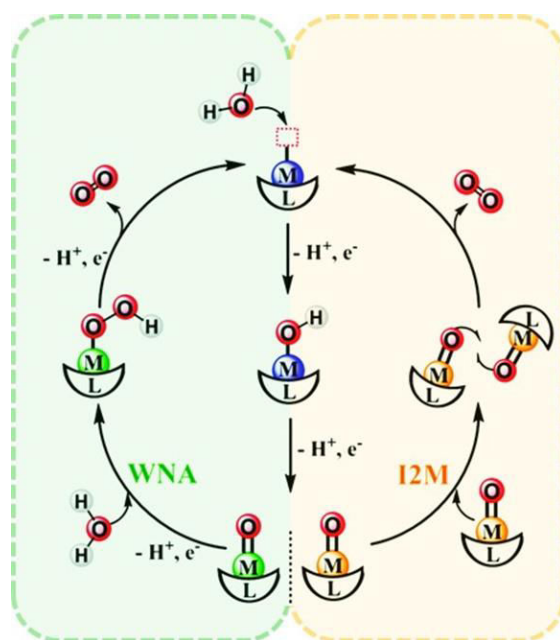


Figure I.14 : Représentation schématique des deux voies possibles pour l'oxydation de l'eau par des catalyseurs moléculaires. En vert : l'attaque nucléophile de l'eau (WNA) et en jaune : le couplage bimoléculaire de radicaux métal-oxo (I2M). Reproduit de la réf¹⁸

Ces deux mécanismes ont en commun la génération d'un intermédiaire métal oxo de haut degré d'oxydation obtenu à partir du complexe aquo après deux étapes de transfert d'électron couplé à un transfert de proton (**PCET**) (Figure I.15).

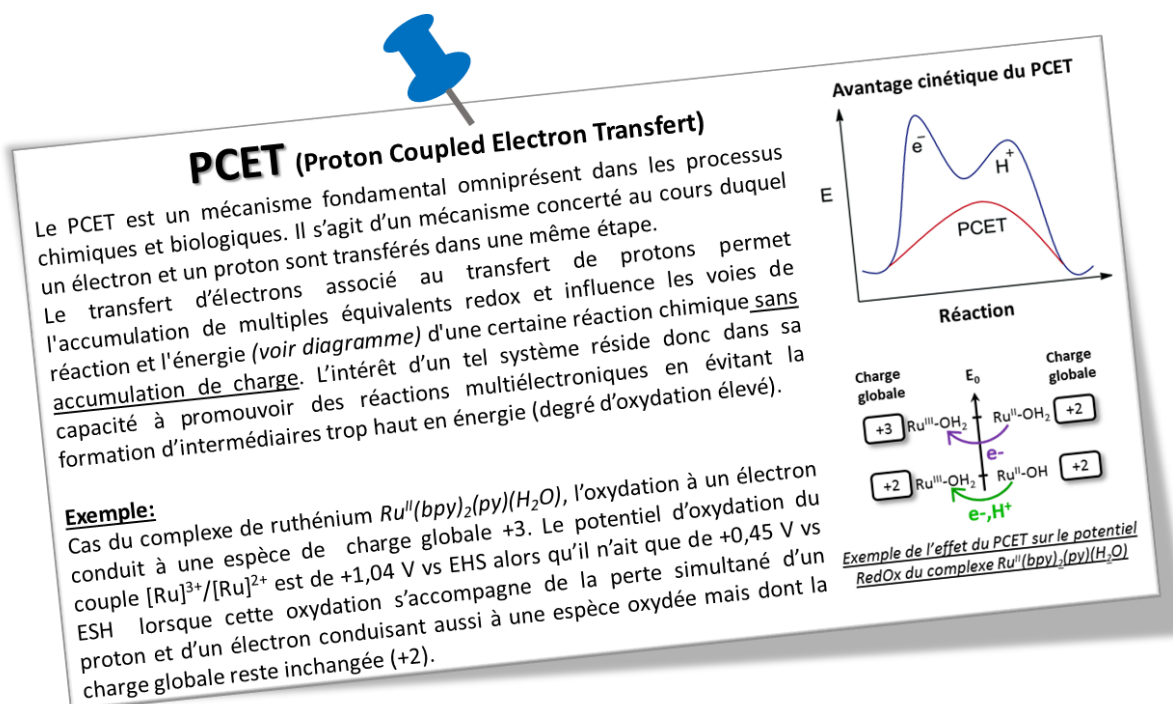


Figure I.15 : Principes de fonctionnement du PCET. ³³

Dans le cas du ruthénium, l'espèce $Ru^{IV}=O$, si elle est effectivement capable d'oxyder l'eau, a aussi été décrite comme permettant l'oxydation de substrats organiques tels que des sulfures, phosphines, alcènes. Cette constatation a encouragé le développement de complexes de ruthénium polyazotés capables d'accéder à de nouvelles réactivités allant pour les complexes de dernière génération jusqu'au craquage du benzène.³⁴

B. Les complexes de ruthénium polyazotés en (photo)catalyse d'oxydation de substrats organiques

1. Systèmes mononucléaires

Dans les années 80, le complexe de ruthénium $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})\text{O}]^{2+}$ a été le premier complexe décrit par Meyer comme étant capable de réaliser l'oxydation de la triéthylphosphine.³⁵ Bien que le système ne soit pas catalytique car le complexe avait été obtenu après oxydation au Ce^{IV} de son homologue aquo, il a ouvert la voie à une génération de complexes de ruthénium pouvant réaliser l'oxydation de diverses molécules organiques telles que les sulfures, les alcènes, les alcanes ou encore les alcools (Figure I.16).³⁶⁻⁵⁰

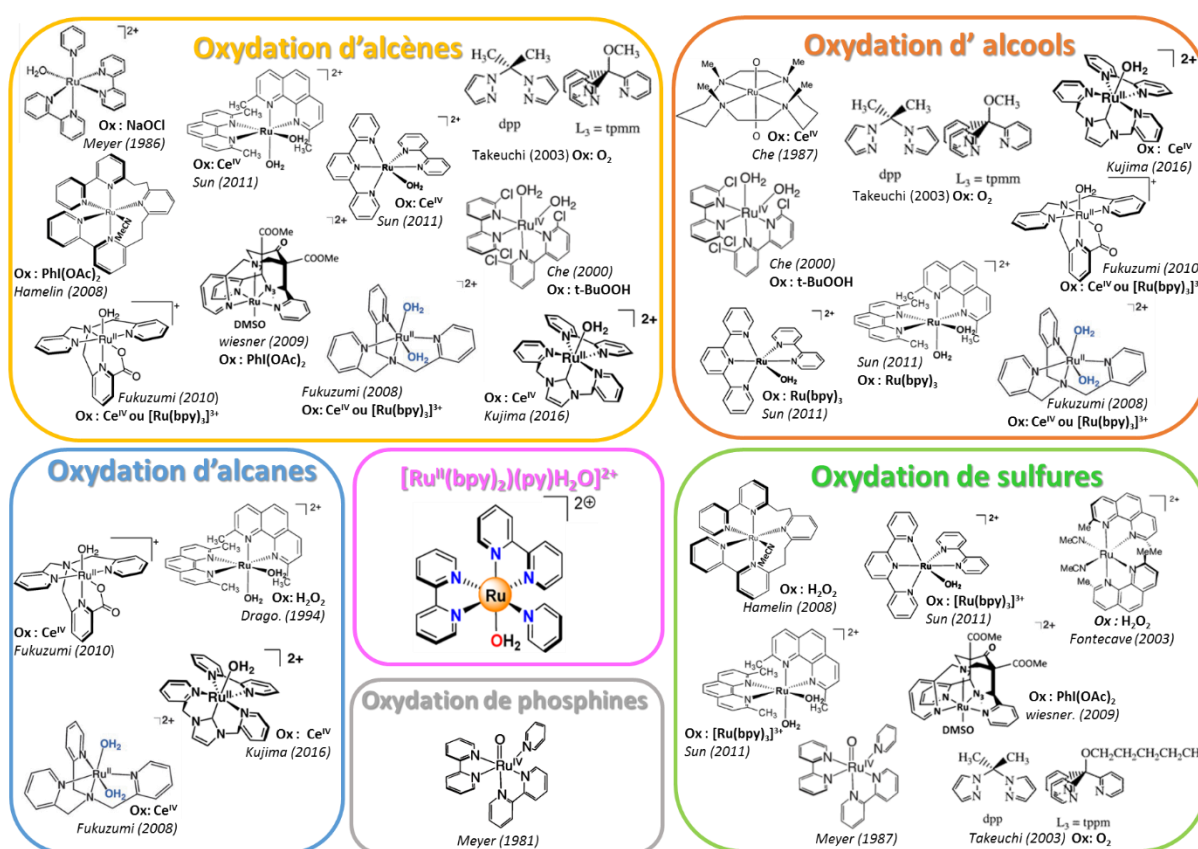


Figure I.16 : Exemples de complexes réalisant l'oxydation catalytique de substrats organiques.

Il est toutefois à noter que deux types de mécanisme différents sont impliqués selon le type de substrat. En effet dans le cas des alcènes possédant une liaison C-H allylique, des alcools et des alcanes un mécanisme de type radicalaire intervient, alors que l'oxydation des sulfures et des phosphines implique une attaque nucléophile sur l'espèce $\text{Ru}^{\text{IV}}=\text{O}$ avec transfert d'un atome d'oxygène (Figure I.17).^{48,51}

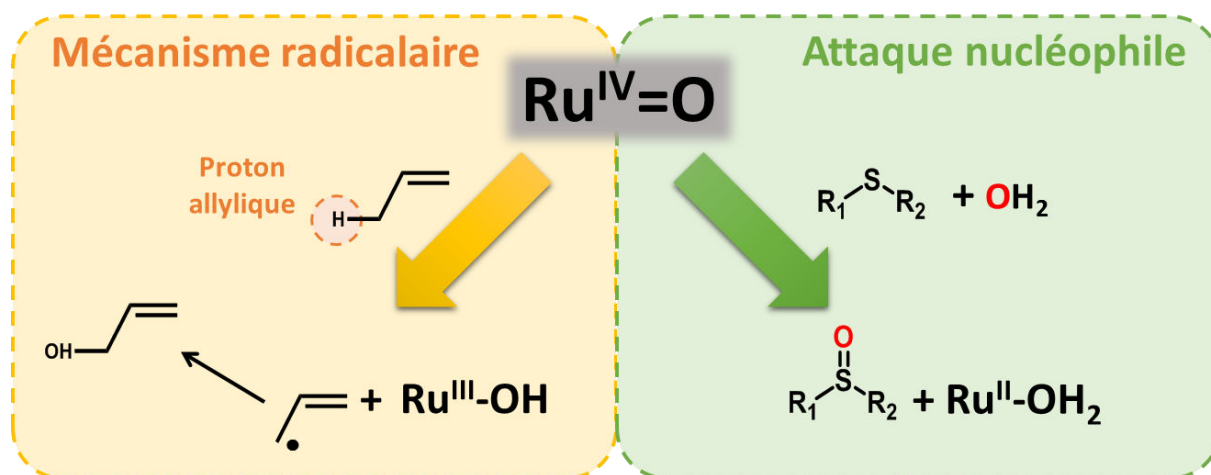


Figure I.17 : Mécanismes possibles pour l'oxydation de substrats organiques par $\text{Ru}^{\text{IV}}=\text{O}$. En vert transfert d'oxygène par attaque nucléophile et en jaune mécanisme radicalaire. Inspirée de la réf⁵¹

Concernant l'époxydation des alcènes sans proton allylique, cette réaction peut être réalisée en passant par les deux mécanismes.⁵² De plus, ces complexes sont rendus catalytiques par la présence d'oxydants forts ($\text{PhI}(\text{OAc})_2$, Ce^{IV}) permettant de générer l'espèce active $\text{Ru}^{\text{IV}}=\text{O}$.

Cependant, il y a peu d'exemples où ces oxydants ont été remplacés par un photosensibilisateur associé à un oxydant plus faible communément appelé accepteur d'électrons sacrificiel. Les deux exemples disponibles dans la littérature utilisent un complexe de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ comme chromophore couplé à un sel de cobalt ($[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$) comme accepteur d'électron sacrificiel. Dans ces conditions, les équipes de Sun⁵³ et de Fukuzumi⁵⁴ ont rapporté des résultats en catalyse d'oxygénations de sulfures et d'oxydations d'alcools respectivement.

En parallèle de ces systèmes bimoléculaires ont été développés des systèmes binucléaires : les dyades où le catalyseur et le chromophore sont covalamment liés permettant d'augmenter l'efficacité du transfert d'électron entre les deux partenaires.

2. Systemes binucléaire : les dyades

Les dyades se composent en général d'un chromophore appartenant à la famille du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ couplé à un catalyseur de ruthénium possédant des ligands azotés de type terpyridine, bipyridine ou phénanthroline ainsi qu'un ligand aquo indispensable à la formation de l'espèce oxo. Comme leurs homologues mononucléaires, elles sont capables de réaliser des réactions d'oxygénation ou d'oxydation.

Il existe assez peu de dyades photocatalytiques de ruthénium dédiées à l'oxydation de substrats organiques (Figure I.18).⁵⁵⁻⁶⁰ En effet, la priorité est donnée au développement de dyades pour l'oxydation de l'eau, et bien qu'il soit probable qu'elles puissent également être en mesure de réaliser l'oxydation de substrats organiques, cette thématique de recherche reste peu usitée.

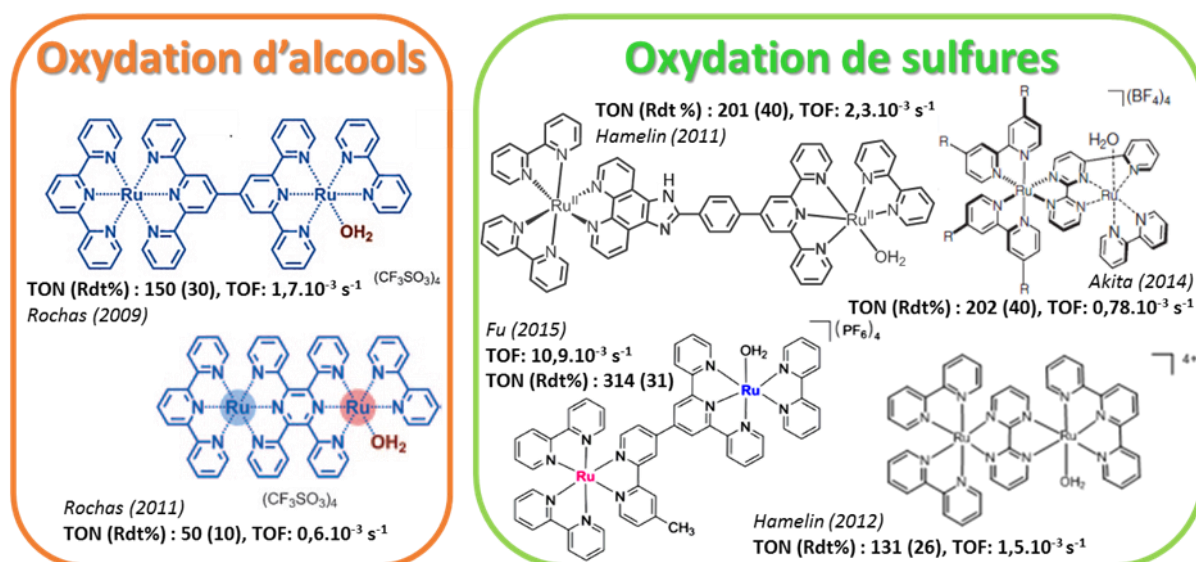


Figure I.18 : Dyades Ru-Ru pour la photooxydation de substrats organiques avec $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ comme accepteur d'électrons sacrificiel et l'alcool benzylique ou le 4-bromothioanisole comme substrat.

Le mécanisme de ces dyades repose sur l'irradiation du partenaire chromophore, initiant un transfert d'électron photoinduit vers l'accepteur d'électrons. Ceci conduit à l'oxydation de l'entité catalytique en $\text{Ru}^{\text{IV}}=\text{O}$ alors capable d'oxyder un substrat organique (Figure I.19). Dans ces systèmes, l'eau est la seule source d'atome d'oxygène.

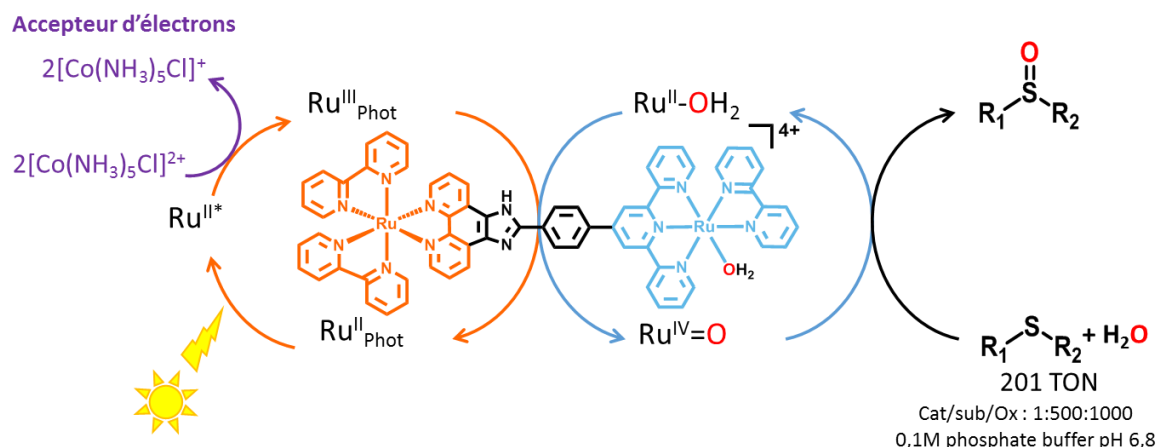


Figure I.19 : Schéma du cycle photocatalytique d'une dyade Ru-Ru. Inspiré de la réf⁵⁷

Bien que ces systèmes utilisent du ruthénium qui reste un élément particulièrement onéreux (mais cependant utilisé en quantité catalytique), ils répondent néanmoins à de nombreuses caractéristiques de la chimie verte. En premier lieu, l'eau est la seule source d'atome d'oxygène. De plus l'énergie nécessaire à l'activation de cette molécule est fournie par la lumière. Cette entité présente une certaine activité et une efficacité améliorée (201 TON, TOF : $2,3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) par rapport aux systèmes bimoléculaires (71 TON, TOF : $0,8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$).

Cependant la stabilité de ces entités est modérée. Par exemple, la dyade de la Figure I.19, est dégradée à 60 % après 24 h d'irradiation, probablement en raison de la photolabilisation des ligands de l'entité chromophore durant la catalyse. De plus, la synthèse des dyades reste délicate et enfin l'introduction de ligands chiraux permettant d'accéder à des réactions énantiosélectives ajouterait de la complexité à la synthèse.

Une des solutions envisageables consisterait à internaliser ces systèmes au sein d'une matrice chirale. Les protéines, qui présentent une chiralité naturelle en raison de leur composition en acides aminés semblent être des candidates de choix. La métalloenzyme artificielle ainsi formée devrait pouvoir bénéficier des mêmes capacités qu'une enzyme « naturelle », à savoir une grande efficacité tant au niveau du rendement, de la vitesse de réaction que de la sélectivité et de la stabilité.

III. La biocatalyse

A. Concept général

La biocatalyse est l'utilisation d'enzymes ou d'organismes pour catalyser une réaction de synthèse organique. Les enzymes sont les catalyseurs les plus répandus sur Terre. Tous les êtres vivants, de l'organisme unicellulaire aux mammifères supérieurs en passant par les plantes maintiennent leurs métabolismes grâce aux réactions enzymatiques. Les enzymes sont composées d'une structure protéique accueillant en son sein le site actif, lieu de la réaction, généralement situé dans un sillon ou une poche (Figure I.20). Il peut être uniquement protéique ou être constitué d'un centre métallique. Un tiers des enzymes sont des métalloenzymes. Le site actif est structurellement optimisé en termes de topologie, de charges et d'hydrophobie/hydrophilie pour un couple substrat/réactivité particulier donnant ainsi une spécificité extrêmement élevée.

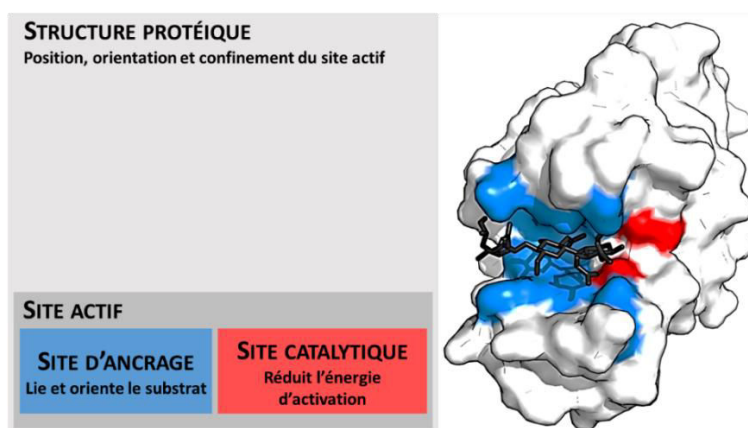


Figure I.20 : Exemple de l'organisation structurale d'une enzyme; ici le lysozyme avec son substrat : le peptidoglycane.⁶¹

Les enzymes possèdent de nombreux avantages (Figure I.21) expliquant pourquoi la biocatalyse tient une place de plus en plus importante dans notre société et dans les thématiques de recherche :

- i) Elles sont obtenues à partir de matières premières renouvelables.
- ii) Les conditions d'utilisations sont douces (température et pression ambiantes, pH physiologique, solvants aqueux).
- iii) Elles présentent une très bonne sélectivité (régio-, stéréo- et énantiosélectivité).
- iv) Elles possèdent de plus une très bonne activité vis-à-vis de leurs substrats naturels (TOF allant jusqu'à 10^7 s^{-1}).⁶²

Cependant, les enzymes présentent également quelques limitations qui restreignent encore leur utilisation en synthèse organique tant en recherche que dans l'industrie (Figure I.21) :

i) L'instabilité en conditions non physiologiques (solvants organiques, températures élevées, pH trop basique ou trop acide) qui conviendraient mieux à la plupart des substrats organiques peu solubles en milieu aqueux.

ii) Une diversité de substrats trop réduite liée à leur trop grande sélectivité.

iii) La présence de phénomènes d'inhibition liés à la concentration croissante en produit formé.

iv) La barrière psychologique liée à la méconnaissance des chimistes organiciens quant à l'utilisation d'enzymes en synthèse.

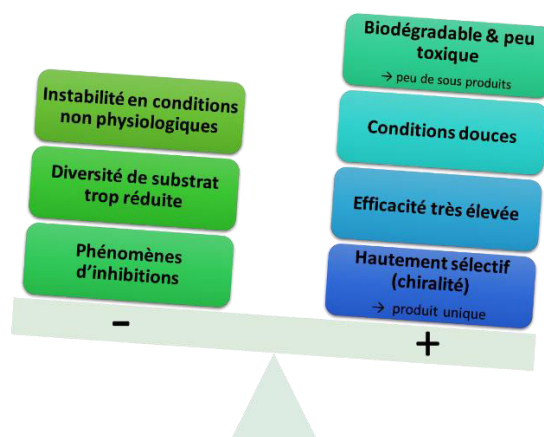


Figure I.21 : Avantages et inconvénients de l'utilisation d'enzymes pour la catalyse en synthèse organique.

Néanmoins, il est possible de trouver des voies d'amélioration grâce notamment à l'ingénierie génétique qui permet de moduler les propriétés enzymatiques grâce à des mutations sur la séquence même du site actif de la protéine.

Les chimistes qui ne maîtrisent pas cette technologie adoptent depuis quelques décennies une autre stratégie : le développement d'enzymes artificielles et plus spécifiquement de métalloenzymes artificielles combinant un complexe inorganique avec un squelette protéique. Ce nouveau domaine de la chimie connaît une expansion assez considérable depuis le début des années 2000.

Enfin, il a aussi été montré que les enzymes pouvaient être immobilisées sur divers supports afin d'augmenter leur stabilité mais également faciliter leur recyclage ainsi que leur séparation des produits de la réaction (catalyse hétérogène).

B. Amélioration du biocatalyseur par ingénierie génétique – L'approche des biochimistes

L'augmentation de l'utilisation des biocatalyseurs est intimement liée au développement des outils d'ingénierie génétique qui connut un essor considérable à la fin des années 70 grâce au développement de la mutagenèse dirigée. Cette technique mise au point par l'équipe de Smith permet de remplacer un acide aminé spécifique par n'importe lequel des dix-neuf autres, ouvrant ainsi la voie aux modulations de structures et de propriétés catalytiques.⁶³

1. Conception rationnelle : mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a permis le développement d'une nouvelle stratégie appelée conception rationnelle (rational design) dont l'objectif est de réaliser des mutations sur un ou plusieurs acides aminés choisis, généralement ceux du site actif de l'enzyme. Cette technique présente l'avantage d'être une approche simple d'ingénierie génétique, peu coûteuse et relativement facile techniquement. Bien que cette stratégie ait déjà été couronnée de succès, par exemple en substituant rationnellement deux acides aminés du site actif d'une estérase la transformant ainsi en une hydroxynitrile lyase⁶⁴, elle souffre d'un inconvénient majeur : celui de devoir connaître la structure de l'enzyme pour pouvoir cibler les acides aminés intéressants à modifier. Malheureusement même si le nombre de structures connues et déposées dans la PDB augmente considérablement, ceci n'est pas toujours le cas. De plus les chances d'obtenir les résultats escomptés sont faibles car il est extrêmement difficile de prédire les effets des diverses mutations, en partie à cause de la flexibilité et de la dynamique de l'enzyme nécessaire à la catalyse enzymatique et qui ne peuvent être appréhendées par la structure cristalline.

C'est pourquoi, les méthodes d'ingénieries génétiques se sont adaptées en s'inspirant du système d'évolution par mutation/sélection utilisé par la Nature.

2. Evolution dirigée⁶⁵

L'évolution dirigée est une méthode qui imite le processus de sélection naturelle afin d'orienter l'activité des protéines vers un but défini comme par exemple une plus grande résistance aux solvants organiques ou encore l'acquisition d'une affinité pour une famille de substrats non naturels.

Elle consiste à soumettre un gène à des cycles répétés de mutation (création d'une bibliothèque de mutants), de sélection (expression de ces mutants et isolement des éléments ayant la fonction souhaitée) et d'amplification (génération d'un modèle pour le cycle suivant). Elle peut être réalisée in vivo, ou in vitro (Figure I.22).⁶⁶

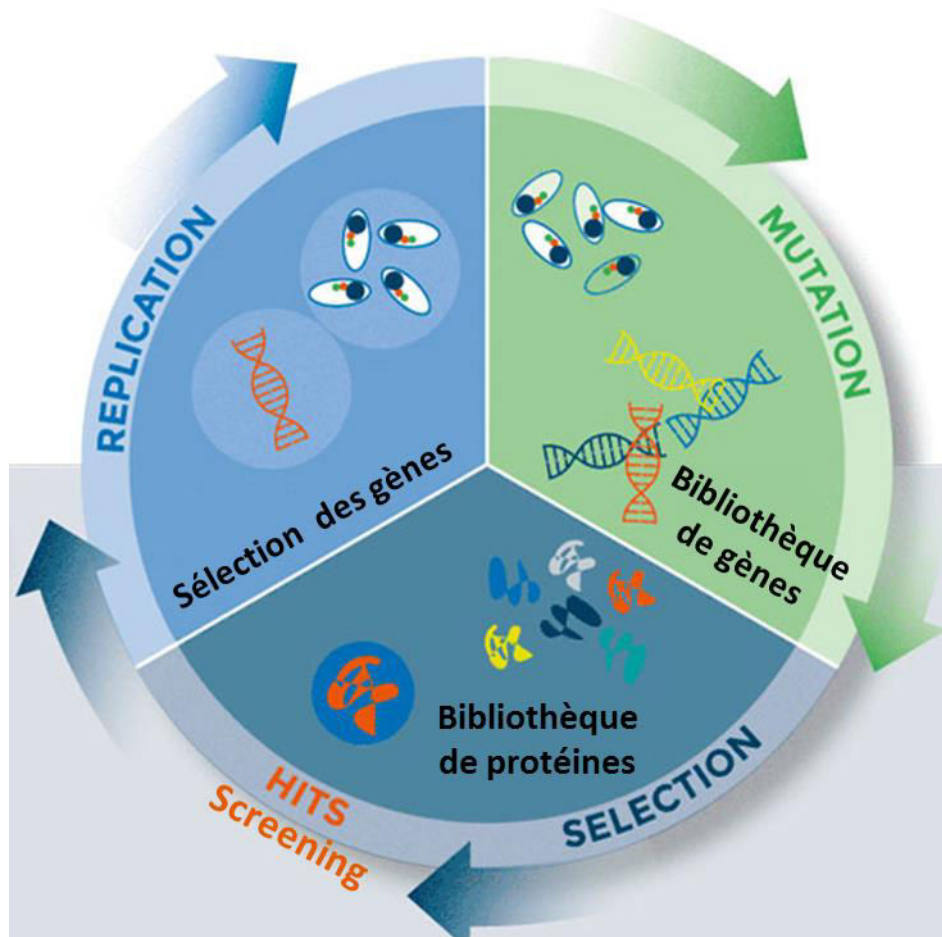


Figure I.22 : Représentation schématique du principe d'évolution dirigée. Traduit de la réf⁶⁶

De nos jours, c'est la technique la plus utilisée. Elle a en effet donné de très bons résultats en améliorant les performances d'enzymes permettant ainsi leur utilisation comme biocatalyseurs dans l'industrie. Un des exemples le plus parlant est certainement le procédé Codexis utilisé industriellement depuis 2006 dans la synthèse d'un intermédiaire chiral de l'atorvastatine (anticholestérol le plus vendu au monde).

La synthèse implique un processus enzymatique en deux étapes nécessitant trois enzymes. La première étape est une réduction asymétrique catalysée par la cétoréductase (KRED) enzyme à cofacteur NADPH. Ce dernier est régénéré par la glucose déshydrogénase (GDH). La seconde étape est réalisée par l'halohydrine déhalogénase (HHDH) conduisant à la cyanohydrine correspondante. (Figure I.23⁶⁷)

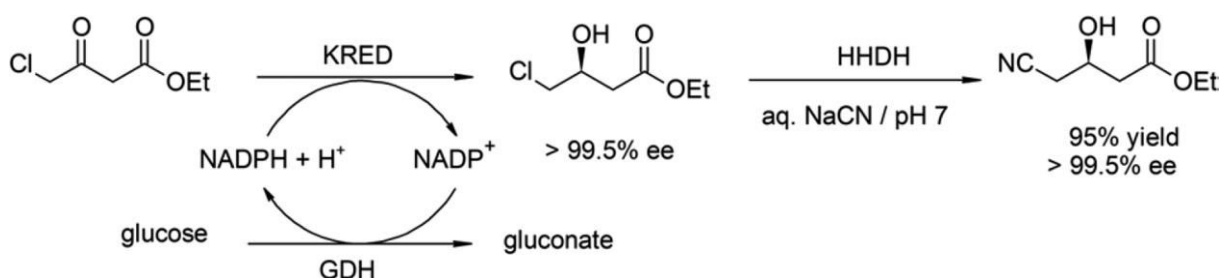


Figure I.23: Procédés Codexis pour la synthèse d'un intermédiaire chiral de l'atorvastatine. Reproduit de la réf⁶⁷

La technique de mutagenèse dirigée appliquée à ces trois enzymes a permis d'obtenir des mutants présentant des améliorations impressionnantes de tous les paramètres catalytiques (vitesse de réaction, rendement, TON...). Plus particulièrement, le TON du couple KRED/GDH a été multiplié par 30 et l'efficacité de la seconde enzyme par 2500 permettant de produire 220 tonnes par an de cyanohydrine. L'amélioration spectaculaire des propriétés clés des trois enzymes constitue un exemple parfait de la force de l'évolution dirigée dans le développement de procédés biocatalytiques viables à l'échelle industrielle.

3. Ingénierie des voies métaboliques

Une alternative à l'emploi d'enzymes *in vitro* est l'utilisation de cellules complètes en modifiant leurs voies métaboliques afin de les transformer en usines de production pour des molécules d'intérêt.⁶⁸ Dans la plupart des cas, ce sont des produits naturels complexes à visée thérapeutique. Cependant, un intérêt est également porté à la production de composés simples comme l'éthanol en raison de son utilisation comme biocarburant.⁶⁸

Si l'ingénierie métabolique n'est pas nouvelle, puisque dès les années 80, *Escherichia coli* a été modifiée pour produire des composés d'importance tels que l'insuline⁶⁹, les progrès réalisés au cours de ces dernières décennies, en biologie synthétique et en particulier dans les sciences omiques (génomique, protéomique, transcriptomique, métabolomique) ont fourni les outils nécessaires à l'essor de ce domaine.

Un exemple d'intérêt est le développement d'une voie hémisynthétique utilisée industriellement par Sanofi depuis 2013 pour la synthèse de l'artémisinine (35 tonnes/an), un antipaludique habituellement extrait de la plante *Artemisia annua*.⁷⁰ Le métabolisme de la levure *S. cerevisiae* a été modifié afin de produire l'acide artémisinique, un intermédiaire clé de la synthèse de l'artémisinine (Figure I.24).⁷¹

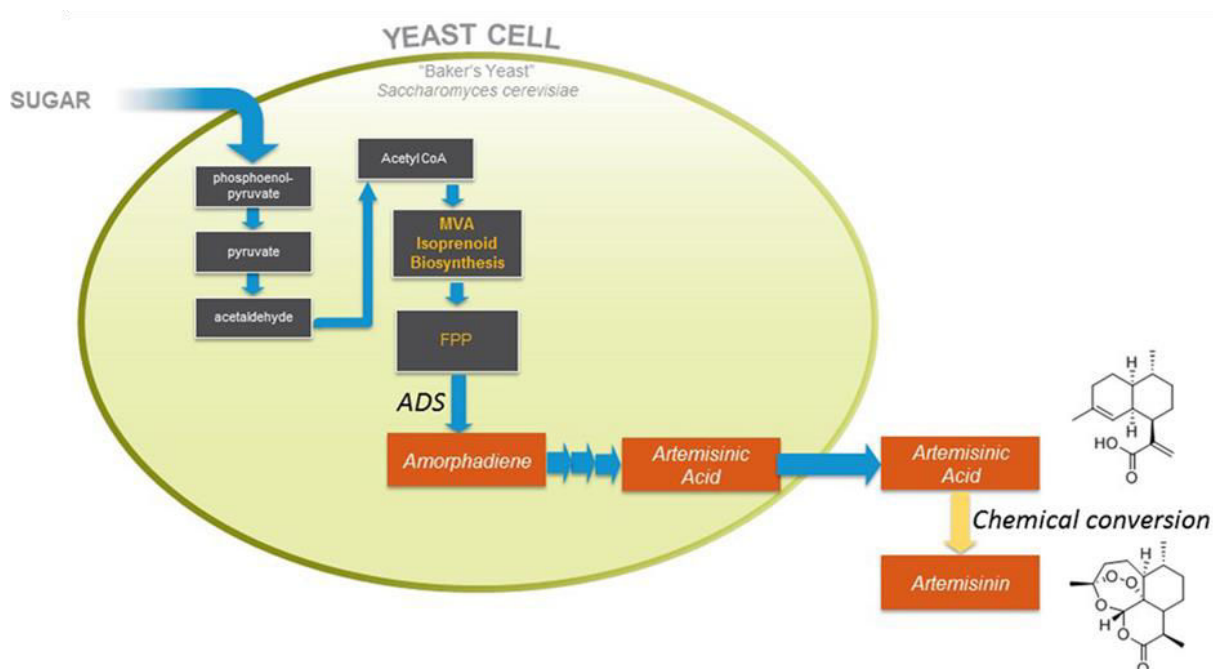


Figure I.24 : Schéma des voies métaboliques des souches de levure *S. cerevisiae* permettant la production d'acide artémisinique et sa conversion en artémisinine. Reproduit de la réf⁷⁰

4. Conclusions

Les progrès réalisés au cours des dernières années en termes de génie génétique et biochimique ont permis le développement de systèmes extrêmement performants et utilisables à l'échelle industrielle, même si ceux-ci restent peu nombreux.

Il faut cependant garder à l'esprit que la biocatalyse est un domaine très récent alors que la chimie organique a évolué pendant deux cents ans avant d'aboutir à sa forme actuelle. Il est fort probable qu'avec le développement des outils adéquats, la biocatalyse connaîtra dans un futur proche un formidable essor.

En parallèle, une approche complémentaire séduisante concerne l'utilisation de catalyseurs hybrides qui combinent à la fois la grande complexité des systèmes biologiques avec la flexibilité et la diversité offerte par la chimie de synthèse afin de bénéficier des avantages des « deux mondes » (Figure I.25). Cette combinaison a donné naissance aux **métalloenzymes artificielles** qui utilisent l'activité et la diversité inégalée des catalyseurs inorganiques, ainsi que le potentiel d'énantiosélectivité d'un support enzymatique ou protéique.

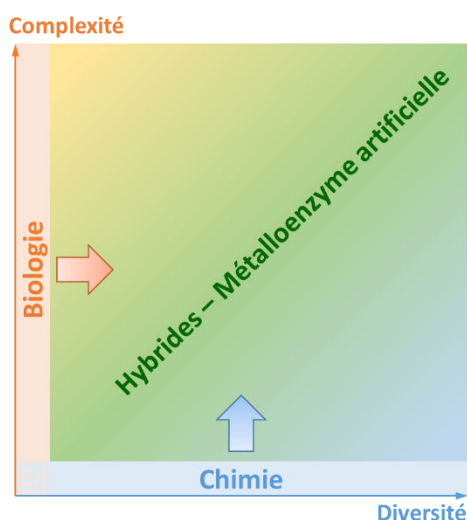


Figure I.25 : Les métalloenzymes artificielles : le meilleur des deux mondes. Inspirée de la conférence du Pr J.-M. Lehn « From Matter to Life : Chemistry ?! ».

C. Les métalloenzymes artificielles (ArM) – L'approche des chimistes

1. Design des métalloenzymes artificielles

a) Concept général

Une métalloenzyme artificielle est généralement composée d'un complexe inorganique présentant une certaine activité inséré au sein d'une biomolécule (protéine, peptide ou ADN).⁷² Le site actif se compose de deux sphères de coordination (Figure I.26) :

- La première sphère correspondant aux ligands du métal, siège de la réactivité.
- La seconde sphère est constituée de quelques acides aminés du squelette protéique interagissant avec le complexe inorganique et qui apportent la sélectivité.

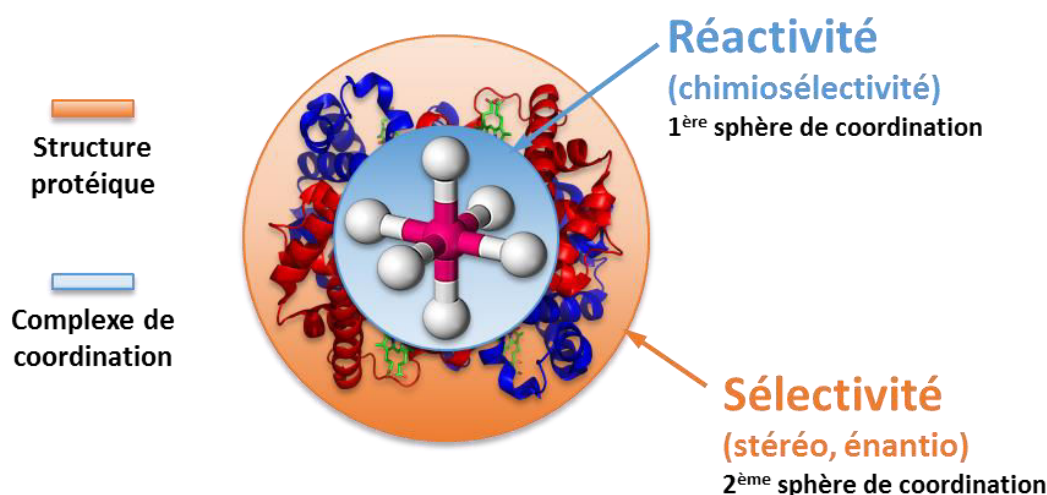


Figure I.26 : Schéma de la composition d'une métalloenzyme artificielle.

Les métalloenzymes artificielles sont donc formées de deux éléments différenciés qu'il est possible de modifier indépendamment afin de moduler les propriétés catalytiques. Par exemple, la nature du métal ainsi que les ligands associés vont permettre d'influer sur la l'efficacité catalytique ainsi que sur le type de réaction ciblée alors que la modification de la protéine, relativement aisée par ingénierie génétique (voir partie III.B), va permettre de moduler la sélectivité (régio ou stéréo) en modifiant les interactions entre le substrat et les acides aminés présents au sein du site actif artificiel (liaisons hydrogène et ionique, interactions hydrophobes ou encore contraintes stériques).

Le concept de métalloenzymes artificielles a été introduit à la fin des années 70 par deux équipes pionnières dans ce domaine. En 1976, L'équipe de Kaiser décrit la conversion d'une carboxypeptidase A en une oxydase (oxydation de l'acide ascorbique) par « simple » remplacement de l'atome de zinc physiologique par un atome exogène de cuivre.⁷³ Deux ans plus tard, un article de Wilson et Whitesides décrit la transformation de l'avidine, une protéine sans activité catalytique en une hydrogénase par introduction d'un complexe de rhodium.⁷⁴ Bien que ces travaux précurseurs aient ouvert la voie, l'utilisation de métalloenzymes artificielles a longtemps été considérée comme une curiosité.

Il aura fallu attendre le début des années 2000 pour que le domaine connaisse un regain d'intérêt et une nouvelle dynamique se traduisant par un nombre de publications en constante augmentation (Figure I.27).

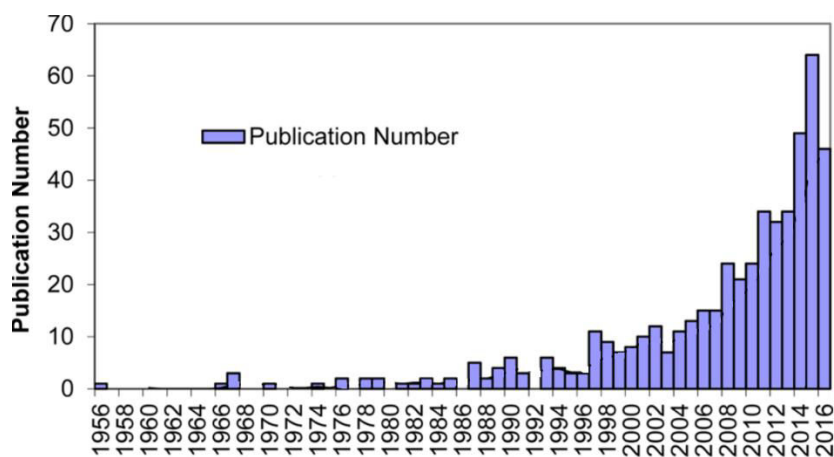


Figure I.27 : Nombre de publications annuelles du domaine entre 1956 et 2016. Repris de la réf⁷⁵

Depuis lors, le domaine évolue rapidement pour se confronter à de nouveaux défis tels que la recherche de nouvelles réactions catalytiques, le développement de systèmes permettant des réactions en cascade pour aboutir finalement à de la chimie *in vivo*. Ce chapitre se concentre sur des exemples clés et les développements récents dans le domaine des métalloenzymes artificielles.

b) Conception

Etant donné que chacun des deux partenaires a une forte influence sur la réactivité finale, plusieurs paramètres clés doivent être pris en compte lors de la conception d'une métalloenzyme artificielle (Figure I.28).

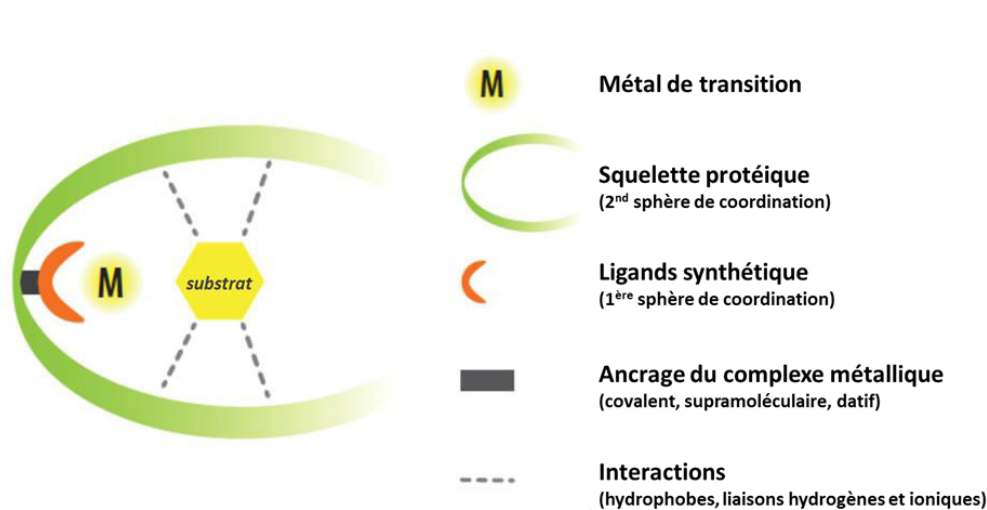


Figure I.28 : Représentation schématique d'une métalloenzyme artificielle.

Tout d'abord, la protéine est choisie en tenant compte de certains critères tels que la facilité d'expression, de purification, de manipulation et de stockage, la stabilité en conditions catalytiques ou encore de la disponibilité des informations sur sa structure permettant d'adapter la taille du complexe et le type d'ancrage à la protéine.

Le métal et ses ligands quant à eux sont sélectionnés en fonction du type de réaction ciblée. Le type d'ancrage doit lui aussi être judicieusement pensé. En effet, il dépend d'une part de la zone de greffage, de sa structure et du type de résidus présents mais aussi des ligands du complexe inorganique et de sa charge.

c) Stratégies d'ancrage chimiques

Les chimistes ont développé plusieurs stratégies pour réaliser l'ancrage de catalyseurs inorganiques au sein de squelette protéique (Figure I.29) :

- Par substitution du métal physiologique par un autre cation métallique.
- Par interactions supramoléculaires entre le complexe et le squelette protéique.
- Par liaisons datives entre le métal et les résidus protéiques.
- Par liaison covalente entre un ligand du complexe et un acide aminé cible de la protéine.



Figure I.29 : stratégies d'ancrage utilisées dans la conception de métalloenzymes artificielles.

(1) Substitution du cation physiologique

Cette stratégie peut sembler être la plus simple et la plus intuitive puisqu'elle fût la première stratégie employée par l'équipe de Kaiser en 1976. Néanmoins il n'est pas si aisé de faire une telle modification au cœur du site actif d'une enzyme en raison de l'affinité particulièrement élevée pour le métal physiologique (K_d Faible). La première étape consiste à obtenir la protéine sous sa forme *apo* c'est-à-dire sans métal. Plusieurs stratégies sont envisageables soit en utilisant un chélatant chargé de capter le métal physiologique pour le déplacer du site actif soit en produisant et purifiant directement la protéine sous sa forme *apo*. Ensuite, la seconde étape consiste à introduire le métal d'intérêt par métallation.

On peut citer l'exemple des travaux effectués sur les anhydrases carboniques par les équipes de Kalzlaustas⁷⁶ et de Soumillion⁷⁷ qui ont pu remplacer l'atome de zinc physiologique par du manganèse formant ainsi une nouvelle enzyme capable de réaliser l'époxydation énantiosélective d'alcènes en présence d'eau oxygénée (Figure I.30).

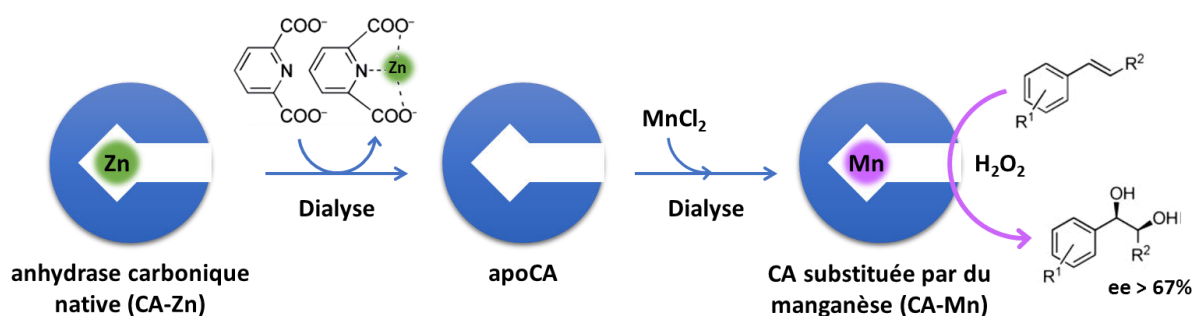


Figure I.30 : Substitution de l'atome de zinc du site actif de l'anhydrase carbonique d'érythrocytes bovins par du manganèse. Inspirée de la réf⁷⁶

Cependant, cette stratégie présente un certain nombre d'inconvénients. En effet, de nombreuses enzymes sont instables ou présentent un mauvais repliement lorsqu'elles sont produites sans leur métal physiologique. Il arrive également qu'il soit impossible de chélater le métal déjà présent ou encore que le nouvel atome métallique ait une affinité trop faible.

(2) Liaisons datives

L'ancrage par liaisons datives consiste en un lien entre certains acides aminés nucléophiles de la protéine (histidine, cystéine, acide glutamique et aspartique, serine....) et un ion métallique. Un des premiers exemples de cette approche a été rapporté en 1983 par l'équipe de Kokubo, qui grâce aux lysines présentes dans l'albumine sérique bovine (BSA) a pu ancrer le tétraoxyde d'osmium. L'hybride BSA-Os ainsi formé a été en capacité de catalyser en présence de tert-butylhydroperoxyde, la dihydroxylation asymétrique d'alcènes avec des excès énantiomériques allant jusqu'à 68%.⁷⁸

Un autre exemple plus récent, rapporté par Ueno, Watanabe et leurs collaborateurs, concerne la ferritine, une protéine de stockage du fer constituée de 24 sous-unités de quatre groupes d'hélices auto-assemblées. Chaque sous unité de l'apo-ferritine présente deux sites de fixations spécifiques permettant chacun de lier spécifiquement deux complexes de palladium [Pd(η^3 -C₃H₅)Cl]₂ portant ainsi à 96 le nombre d'atomes de palladium présents au sein de la ferritine (Figure I.31).⁷⁹

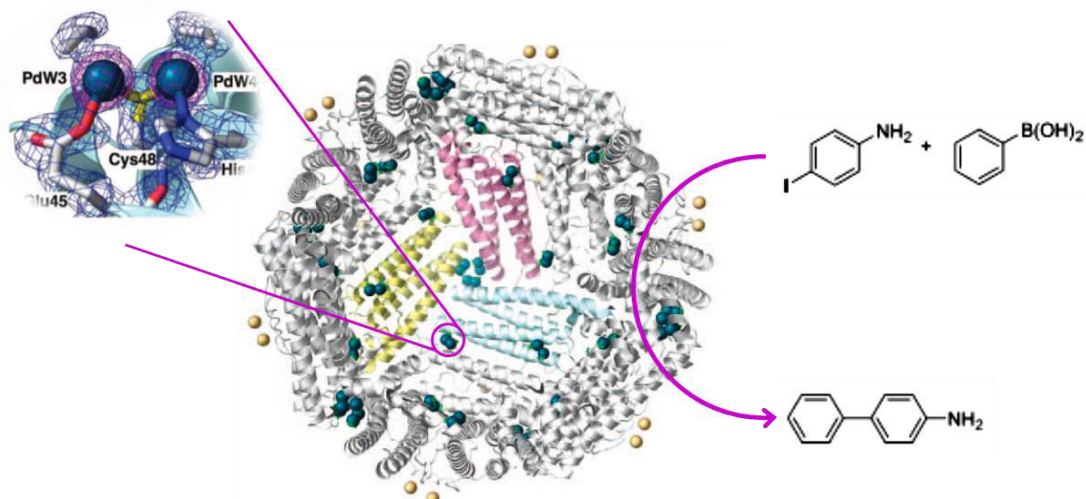


Figure 1.31 : Structure et réactivité en catalyse de couplage Suzuki de l'apo-ferritine-Pd(η^3 -C₃H₅) et zoom sur l'un des deux sites de liaison du Pd. Le Pd est représenté par des sphères bleues. Inspirée de la ref⁷⁹

L'hybride résultant a été en mesure de catalyser le couplage Suzuki-Miyaura entre la 4-iodoaniline et l'acide phénylboronique avec un TOF pouvant atteindre 3500 h⁻¹. Plusieurs mutations ont été introduites autour du site de liaison du Pd. Parmi les mutants, une des variantes a permis d'atteindre un TOF plus élevé de 4300 h⁻¹.

(3) Interactions supramoléculaires

Cette stratégie repose sur l'insertion non covalente d'un complexe inorganique au sein d'un squelette protéique. Le lien est assuré par des liaisons supramoléculaires tels que des interactions hydrophobes/hydrophiles, électrostatiques, de type π -stacking ou encore les liaisons hydrogène. Il existe deux approches :

- La stratégie du cheval de Troie basée sur la forte affinité entre une enzyme et son cofacteur ou substrat naturel auquel est covalentement lié le complexe inorganique.
- La stratégie hôte/invité repose sur la formation de liaisons supramoléculaires entre les ligands du complexe et les acides aminés de la protéine hôte.

(a) Stratégie du cheval de Troie

Cette stratégie utilise la forte affinité (non covalente) d'un inhibiteur pour sa protéine cible. Il est alors possible d'introduire un complexe inorganique au sein de la protéine en le fixant à l'inhibiteur.

Wilson et Whitesides ont montré dès 1978, le premier exemple de métalloenzyme artificielle obtenue grâce à cette stratégie.⁷⁴ Exploitant la remarquable affinité de la biotine pour l'avidine, l'hybride a été formé par incorporation au sein de l'avidine d'un complexe rhodium biotinylé (Figure 1.32). Cet ensemble supramoléculaire a été utilisé pour l'hydrogénation asymétrique de l'acide 2-acétamidoacrylique, permettant une conversion complète avec un excès énantiomérique de 44%.

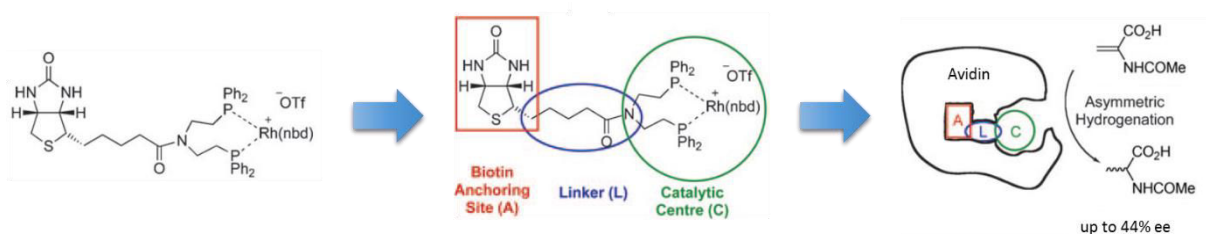


Figure 1.32 : Représentation schématique de la métalloenzyme artificielle développée par Wilson & Whitesides utilisant la technologie biotine-avidine et son application pour l'hydrogénation de précurseurs d'acides aminés prochiraux. Reproduit de la réf⁸⁰

L'affinité entre l'avidine et la biotine est la plus forte interaction protéine-substrat connue dans la nature ($K_d = 10^{-15}$ à 10^{-12} M^{-1}), offrant un terrain de jeu idéal pour le développement de métalloenzymes artificielles, ce qui explique l'utilisation intensive de cette technologie.

Ainsi, les travaux précurseurs de Whitesides et de ses collaborateurs ont inspiré plusieurs groupes, mais une percée importante a eu lieu en 2003 avec le travail de l'équipe de Ward. Elle a en effet constaté que le changement de la protéine hôte pour la streptavidine améliorerait considérablement le système développé par Whitesides passant d'un excès énantiomérique de 44% en faveur de l'énantiomère *S* à un ee de 92 % en énantiomère *R*.

Cette augmentation drastique des performances avec l'hybride streptavidine s'explique par une localisation plus en profondeur du site de liaison ainsi qu'une densité de charge différente entre les deux enzymes. Ward et ses collaborateurs ont ensuite eu recours à une combinaison de techniques chimiques et biochimiques afin d'optimiser d'une part le support protéique et d'autre part la structure du complexe inorganique, devenant ainsi un groupe incontournable dans le domaine des métalloenzymes artificielles.⁷⁵

(b) Stratégie hôte/invité

Dans cette stratégie, le complexe inorganique est développé afin de pouvoir directement interagir par des interactions supramoléculaires avec la protéine hôte.

L'illustration est apportée par l'équipe de Ménage qui a développé une métalloenzyme artificielle en insérant un complexe de fer non hémique dans la protéine NikA (protéine de transport de nickel chez *E. coli*).⁸¹ Le complexe est maintenu au sein de la protéine par un pont salin entre le bras carboxylate du ligand et l'arginine 137 de la protéine, des interactions de type π -stacking entre les pyridines du ligand et les tryptophanes 100 et 398, ainsi que par l'interaction entre la tyrosine 402 et le groupement carboxylate via une molécule d'eau (Figure I.33). Cette étude *in cristallo* a permis d'observer par diffraction des rayons X, les différentes étapes de l'activation d' O_2 par le complexe de fer.⁸²

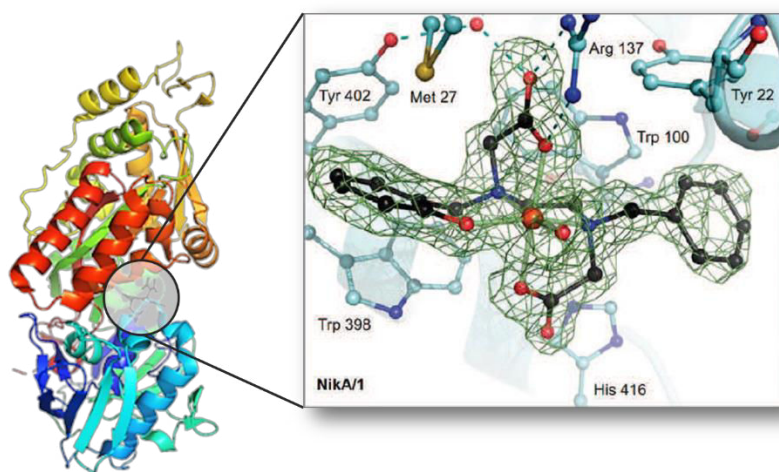


Figure I.33 : Structure cristallographique de l'hybride NikA/Fe-L0.

Après modifications des ligands du complexe de fer, cette enzyme artificielle a été en mesure de réaliser l'oxydation de composés portant un motif thioéther avec une bonne chimiosélectivité de 87% en faveur du composé sulfoxydé (S_1O) (Figure I.34) sans malheureusement montrer d'excès énantiomérique. La faible proportion de composé dichloré (S_1OCl_2) a été formée par une réaction secondaire avec l'oxydant NaOCl.^{83,84}

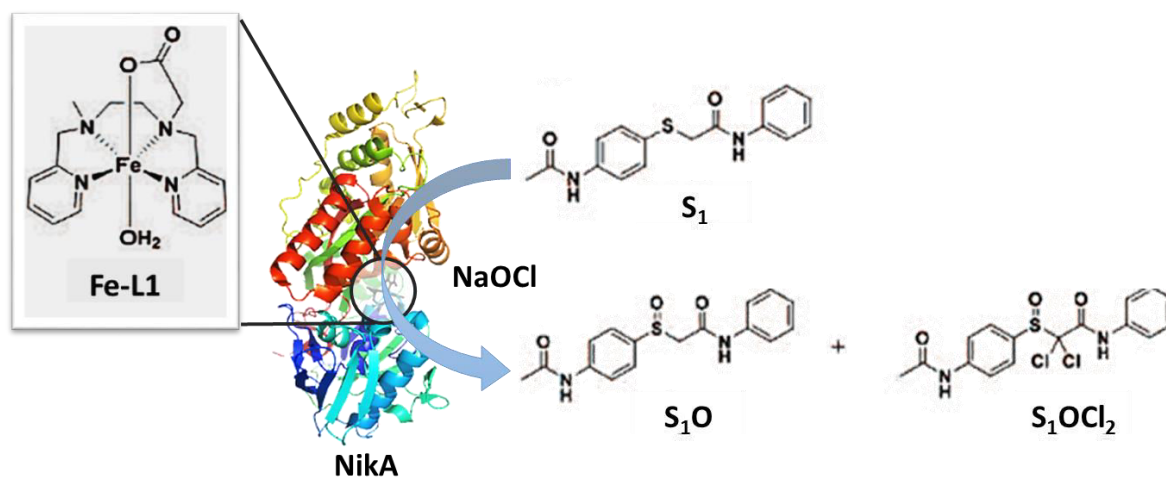


Figure I.34 : Schéma de la réaction catalysée par l'hybride NikA/Fe-L1 en présence de NaOCl comme oxydant.

Cette stratégie repose donc sur la force et la sélectivité des interactions supramoléculaires permettant de garantir une localisation spécifique et régulière des catalyseurs dans l'enzyme hôte. La conséquence directe est une limitation des protéines présentant les bonnes caractéristiques et donc une gamme de protéines utilisables restreintes.

(4) Liaisons covalentes

La création de métalloenzymes artificielles par liaisons covalentes entre un complexe inorganique et un ou plusieurs résidus protéiques appelée bioconjugaison permet justement une plus grande souplesse dans le choix de la protéine hôte. Effectivement cette stratégie, ne demande pas nécessairement de modification de la protéine puisqu'elle peut utiliser les acides aminés naturellement présents dans la séquence. La bioconjugaison est réalisée par l'intermédiaire d'une réaction chimique entre certains résidus acides aminés et une fonction judicieusement introduite sur le ligand du complexe inorganique.

En raison de la stabilité limitée des protéines, les réactions chimiques utilisées pour l'ancrage doivent répondre à certains critères tels que :

- Des conditions de réaction douces (pH physiologique, température ambiante, milieux aqueux) n'entraînant pas la dégradation de la protéine.
- Efficacité réactionnelle élevée (rapidité, conversion complète).
- Une bonne sélectivité des groupements chimiques vis à vis de leurs acides aminés cibles.

Les méthodes de bioconjugaison « classiques » reposent sur des réactions impliquant les acides aminés nucléophiles. Les cystéines et les lysines sont particulièrement exploitées.

La cystéine est le résidu le plus utilisé en raison d'une part de son abondance relativement faible (1,7 %) dans les protéines permettant une bonne sélectivité, mais également en raison de la nucléophilie marquée de sa fonction thiol qui la rend plus réactive que les fonctions amines des lysines et acides carboxyliques des résidus acides glutamiques et aspartiques.⁸⁵

Ainsi la fonction thiol de la cystéine peut être impliquée dans un grand nombre de réactions chimiques (Figure I.35) telles que :

- des oxydations avec la formation de disulfures
- des alkylations avec des électrophiles de type halogénoalcane (iodoacétamide)
- des accepteurs de Michael de type maléimides

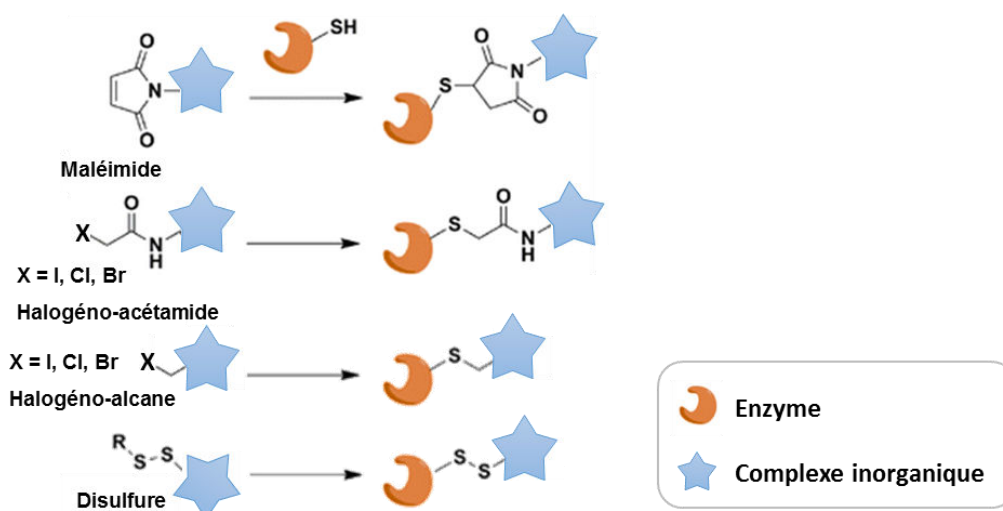


Figure I.35 : Exemples de modification chimique directe sur la cystéine. Inspirée des réf^{86,87}

C'est à la fin des années 1970 que Kaiser et ses collaborateurs ont jeté les bases de la production d'enzymes artificielles par modification covalente avec leurs travaux sur les oxydoréductases de flavopapaïne.⁸⁸ Dans ces systèmes, la cystéine du site actif de la papaïne est alkylée par une flavine portant une fonction bromométhylène. Bien qu'aucun métal n'ait été impliqué dans cet exemple, cette étude a montré que la bioconjugaison pouvait être utilisée pour générer des catalyseurs hybrides et a ainsi ouvert la voie à l'incorporation de cofacteurs métalliques.

Diestefano et ses collaborateurs ont été les premiers à appliquer ce type de stratégie pour créer des métalloenzymes artificielles (Figure I.36).⁸⁹ L'unique cystéine présente à l'intérieur de la cavité de la protéine de liaison aux lipides adipocytes (ALBP) a été modifiée par l'introduction d'un ligand 1,10-phénanthroline grâce à une fonction iodoacétamide. Après complexation avec du cuivre (II), la métalloenzyme (ALBP-Phen-Cu) ainsi formée a été utilisée pour réaliser l'hydrolyse énantiosélective de mélanges racémiques d'esters par dédoublement cinétique avec une bonne sélectivité allant jusqu'à 86% en faveur de l'énantiomère S. Dans une étude postérieure, le même groupe a modifié par mutagenèse dirigée la position de la cystéine (mutation L72C) augmentant ainsi l'énantiosélectivité jusqu'à 94%.⁹⁰

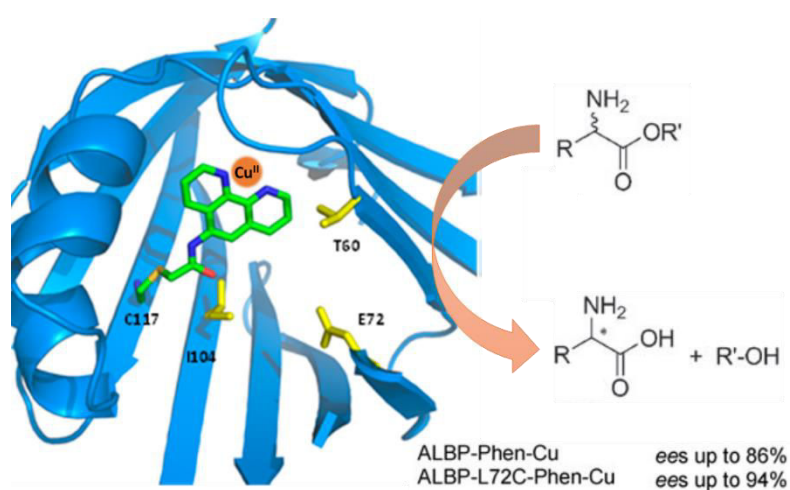


Figure I.36 : Structure et réactivité en catalyse asymétrique énantiosélective de l'hybride ALPB-phen-Cu. Inspirée de la réf⁷⁵

Les réactions sur les lysines ont également été largement explorées en raison de leur abondance relative élevée dans les protéines permettant des conjugaisons multi-sites.

La fonction amine de la lysine peut être impliquée dans de nombreuses réactions chimiques impliquant des électrophiles tels que des acides activés, des isocyanates ou encore des isothiocyanates (Figure I.37).⁹¹

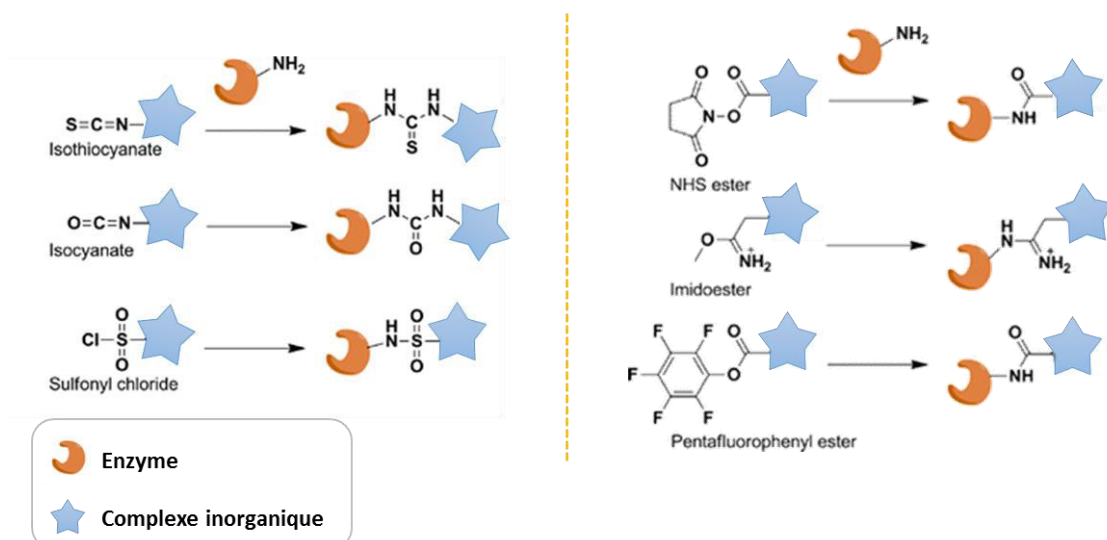


Figure 1.37 : Exemples de modification chimique directe sur la lysine. Inspirée des réf^{86,87}

Les travaux de Ueno et ses collègues sur l'assemblage tubulaire $[(gp5\beta f)_3]_2$ (protéines issues du bactériophage T4), s'appuient justement sur le greffage multi-sites permis par les lysines pour développer une métalloenzyme artificielle capable de réaliser une cycloaddition de Huisgen [3 + 2] entre azoture et un alcyne catalysé par du cuivre (I) (réaction dite click).

Les flavines servant de ligands ont été chimiquement conjuguées grâce à une fonction succinimide aux lysines alignées sur la surface externe du nanotube $[(gp5\beta f)_3]_2$ (Figure 1.38).

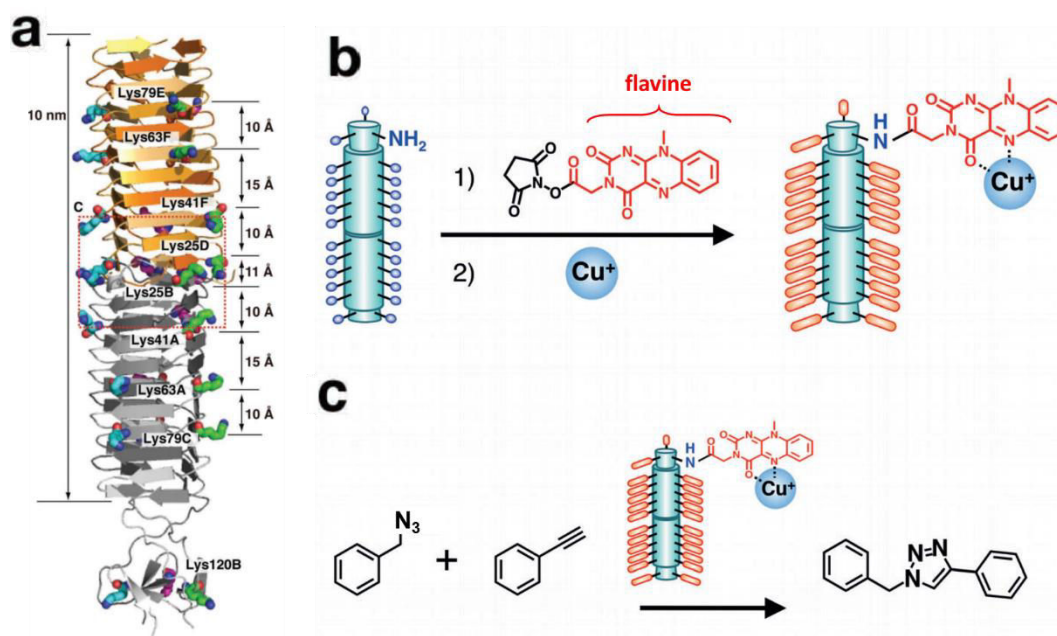


Figure 1.38 : a) Structure cristalline de $[(gp5\beta f)_3]_2$ montrant les résidus lysines présents sur la surface externe. b) Modification des amines primaires de $[(gp5\beta f)_3]_2$ avec un dérivé succinimide de flavine et complexation d'un Cu^+ . c) Réaction de cycloaddition azoture-alcyne [3+2] catalysée par l'hybride. Reproduit des réf^{92,93}

D'autres résidus moins communément utilisés tels que les tyrosines⁹⁴, les acides glutamiques et aspartiques⁹⁵ ainsi que les serines peuvent se révéler précieux lors de projets nécessitant d'autres fonctions d'ancrages.⁹¹

Une stratégie alternative consiste à réaliser l'incorporation d'acides aminés non naturels dans les protéines afin d'exploiter des fonctionnalités chimiques absentes dans les protéines natives. Ceci fait appel à des réactions de conjugaison plus spécifiques comme par exemple des réactions dites « click » entre des dérivés azotures et acétyléniques conduisant à un triazole substitué (Figure I.39).

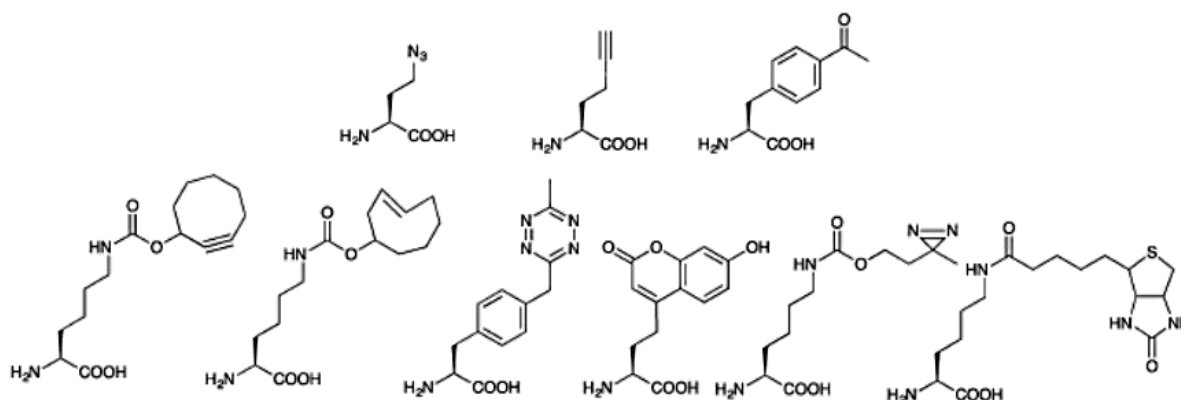


Figure I.39 : Exemples d'acides aminés non naturels utilisés dans la littérature. Reproduit de la réf⁹⁶

Lewis et ses collaborateurs ont utilisé cette approche avec succès en incorporant l'acide aminé non naturel *p*-azido-*L*-phénylalanine (Az) par ingénierie génétique dans la protéine tHisF de *Thermotoga maritima* surexprimée chez *E. coli*.⁹⁷ Ainsi, le complexe de dirhodium substitué par un groupe acétylénique sera lié de manière covalente à la protéine par une réaction de type cycloaddition azoture-alcyne. La métalloenzyme artificielle obtenue a pu catalyser des cyclopropanations d'oléfines et des insertions de groupements silanes (Figure I.40).

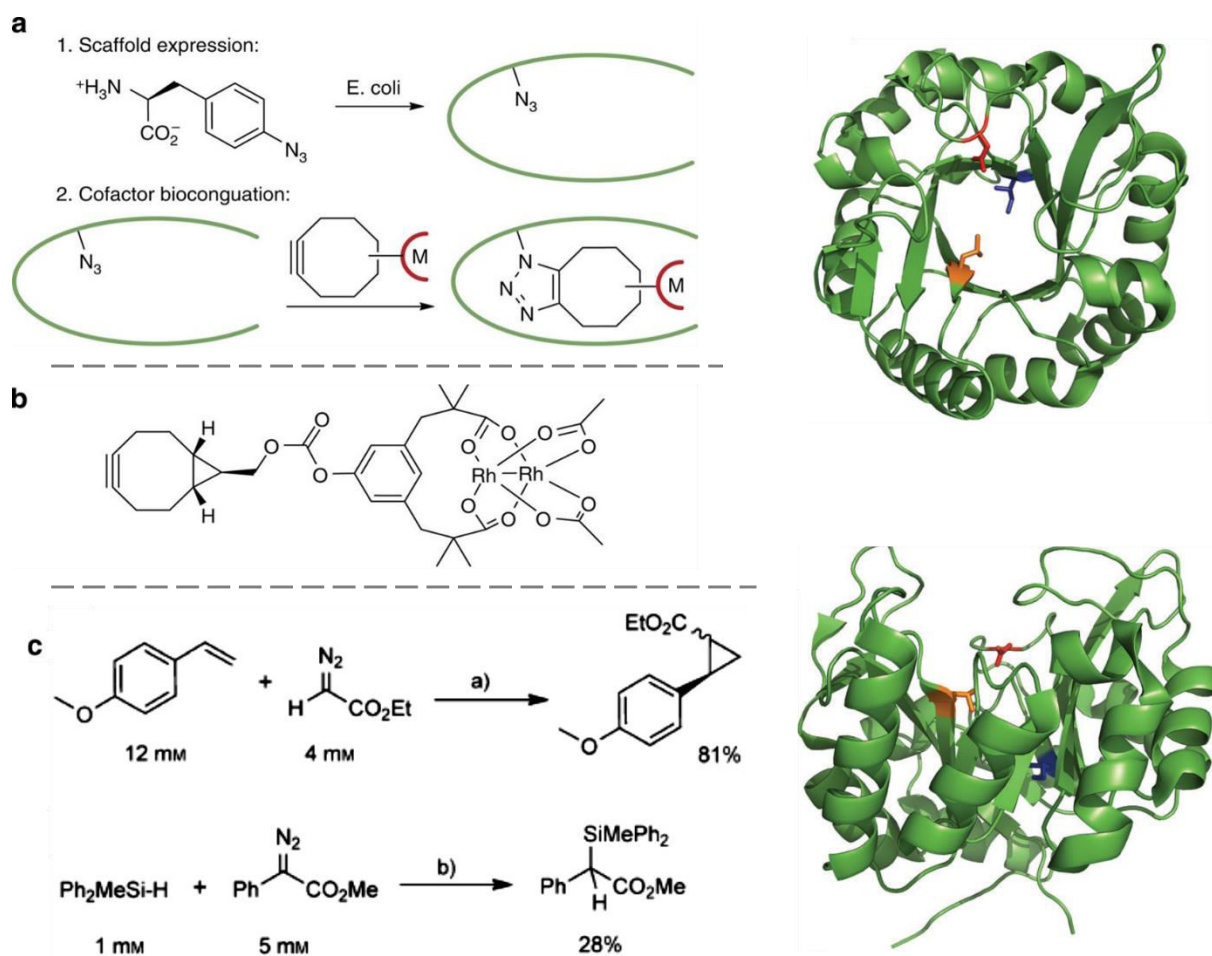


Figure I.40 : Structure de la protéine wt-tHisF- Formation et réactivité de l'ArM. a) Formation d'ArM par réaction click. b) Structure du complexe inorganique de dirhodium. c) Réactions catalysées par l'hybride. Inspirée des réf^{97,98}

Toutes ces méthodes, en raison de leur efficacité et de la facilité de mise en œuvre, de la disponibilité des produits commerciaux et de la littérature abondante s'y référant sont de nos jours particulièrement exploitées par les chimistes. Cependant des techniques développées par les biochimistes issues du génie génétique pourraient s'avérer extrêmement utiles pour développer de nouvelles métalloenzymes artificielles.

d) Stratégies biochimiques - bioconjugaisons enzymatiques

La bioconjugaison peut également être réalisée par voie enzymatique (Figure I.41). Les enzymes généralement utilisées sont les peptidases, les ligases, les transférases et les oxydoréductases.

Ce type d'approche permet entre autre d'immobiliser les protéines sur divers supports (métaux, polymères...) pour par exemple des applications dans le médical ou encore par introduction de fluorophores pour étudier les propriétés des protéines (repliement, dynamique, interactions protéine-protéine).⁹⁶

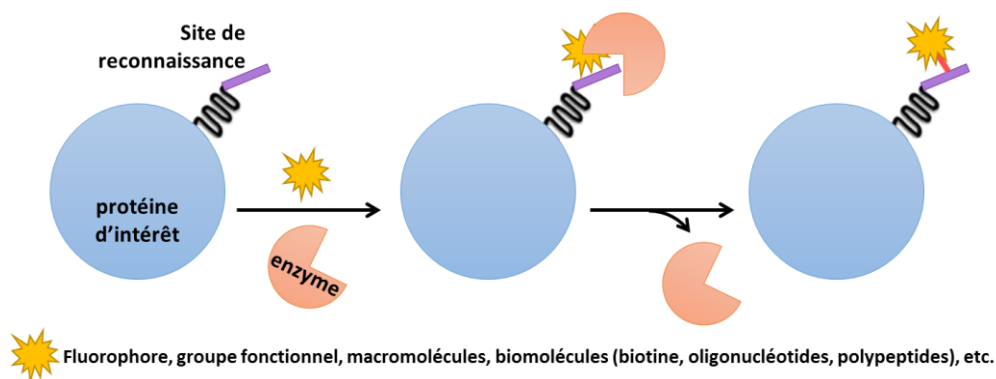


Figure I.41 : Schéma du principe de bioconjugaison par catalyse enzymatique.

Afin d'augmenter le champ des possibles, cette approche pourrait être exploitée pour le développement de nouvelles métalloenzymes artificielles.

2. Les photoenzymes artificielles

Bien que le développement de photoenzymes artificielles ait suscité un intérêt croissant au cours de la dernière décennie, c'est un domaine de recherche encore jeune. Il existe deux grandes stratégies pour la création de photoenzymes artificielles :

- La stratégie bimoléculaire où le photosensibilisateur et l'enzyme sont présents de manière indépendante en solution (Figure I.42a).

- La stratégie binucléaire où le chromophore et l'enzyme sont liés de manière covalente (Figure I.42b).

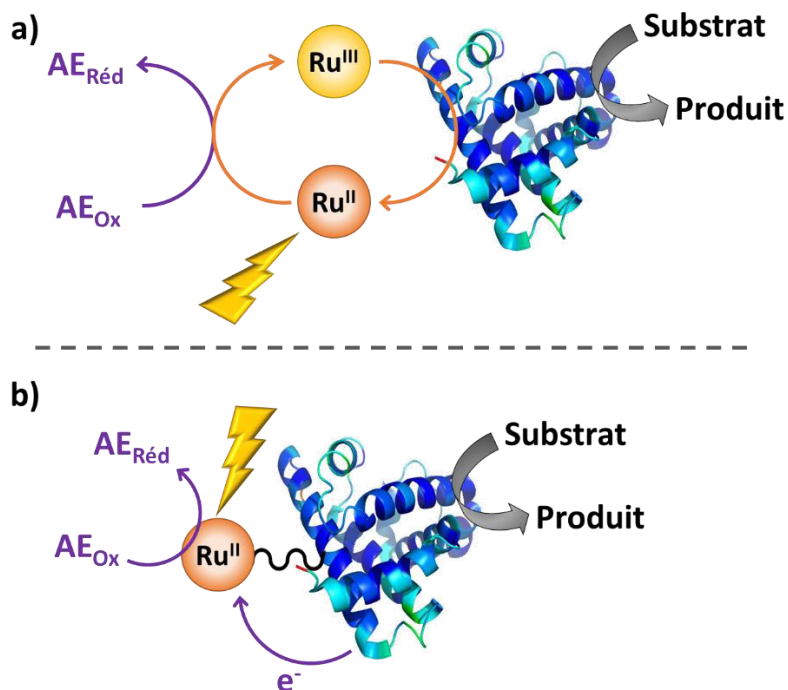


Figure 1.42 : Stratégies possibles pour le développement de photoenzyme artificielle. a) stratégie bimoléculaire. b) stratégie binucléaire.

Même si ces deux stratégies présentent chacune des atouts particuliers, dans la suite de ce manuscrit, en raison de la thématique de ma thèse, l'intérêt sera essentiellement porté sur les systèmes binucléaires.

a) Stratégie bimoléculaire

Cette stratégie est la plus courante. En effet les biologistes l'utilisent essentiellement afin de régénérer les cofacteurs RedOx naturels des enzymes tels que le NAD(P)H ou la ferrédoxine.⁹⁹ Il est également possible de complètement remplacer ces cofacteurs par des chromophores. Les travaux de l'équipe de Willner utilisent un complexe de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en remplacement du NAD(P)H pour la glutathion réductase.¹⁰⁰ Plus récemment l'équipe de Tron a utilisé ce même complexe avec une laccase afin de réaliser la réduction photocatalytique de O_2 .¹⁰¹ Et récemment, ils ont montré qu'il était possible d'utiliser des alcènes comme donneur d'électrons sacrificiels, ceci permettant de faire d'une pierre deux coups. L'oxygène libéré par la laccase grâce aux électrons issus des alcènes permet l'oxydations des espèces radicalaires résultantes en époxyde.¹⁰²

Cette approche a aussi été exploitée par l'équipe de Mahy pour développer des sulfoxydases artificielles.^{103,104}

b) Stratégie binucléaire

Dans cette stratégie, les photoenzymes artificielles sont composées d'une enzyme naturelle ou artificielle liée à un chromophore pouvant être soit inorganique soit naturel (généralement le PSI). Leur développement repose sur trois stratégies principales.

(1) Photoenzymes artificielles composée de catalyseur artificiel couplé à un photosensibilisateur naturel : le PSI

Le PSI est un complexe protéique dont le rôle naturel est d'assurer le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire de la cellule. Sous irradiation, son centre réactif composé de la chlorophylle P700, entraîne *via* un processus RedOx, un transfert d'électrons vers la ferrédoxine qui joue le rôle d'accepteur d'électrons. La chlorophylle P700 est ensuite régénérée par un donneur d'électrons, la plastocyanine.

Ce fonctionnement est transposé aux photoenzymes artificielles dans lesquelles la ferrédoxine est remplacée par un catalyseur d'intérêt et où le donneur d'électrons peut être soit la plastocyanine soit le cytochrome C (CytC) (Figure I.43). Cette stratégie a principalement été utilisée dans le développement de catalyseurs pour la production d'hydrogène comme combustible solaire. Le PSI est alors couplé par des techniques adaptées (ancrage covalent, protéine de fusion, interaction électrostatique ou photodéposition) à des hydrogénases ou à des catalyseurs inorganiques de production d'hydrogène tels que les cobaloximes ou encore à des métaux nobles comme le platine (Figure I.43).¹⁰⁵

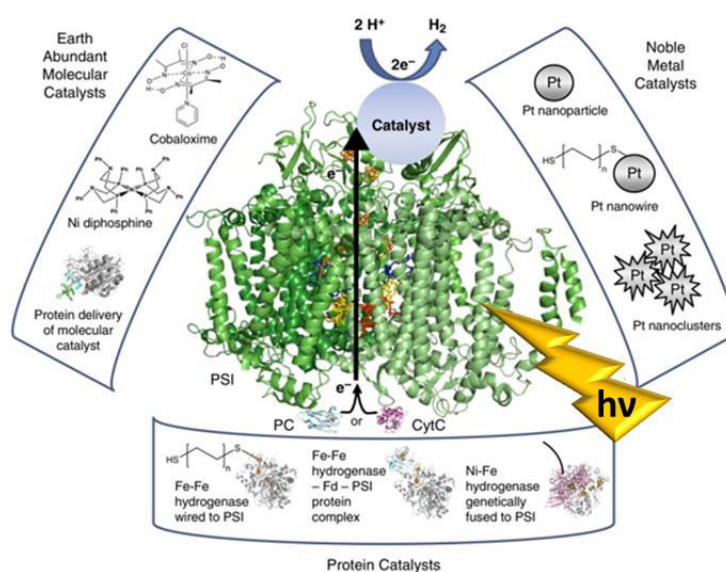


Figure I.43 : Exemples de catalyseurs hybrides utilisant le PSI pour produire H₂. Reproduit de la réf¹⁰⁵

(2) Photoenzyme artificielle composée d'enzymes natives couplées à un photosensibilisateur artificiel

Cette stratégie repose sur l'utilisation de chromophores artificiels comme partenaires RedOx de l'enzyme naturelle afin de s'affranchir des cofacteurs biologiques (NADP⁺/H, protéine partenaire RedOx) et de toute la machinerie enzymatique qui en découle.

Les travaux précurseurs des équipes de Gray¹⁰⁶ et Cheruzel¹⁰⁷ sur les cytochromes P450 ont montré la faisabilité de cette stratégie. A l'état natif, Les cytochromes P450 sont des enzymes hémiques capables de sélectivement fonctionnaliser des liaisons C-H en utilisant du dioxygène moléculaire et deux électrons fournis par un partenaire redox dépendant du NADPH : la cytochrome P450 réductase (CPR) (Figure I.44a). Dans ce travail, afin de contourner la dépendance à la réductase, le partenaire RedOx naturel (couple CPR/NADPH) du cytochrome P450 BM3 de *Bacillus megaterium* a été remplacé par un photosensibilisateur artificiel de ruthénium dérivé de [Ru(bpy)₃]²⁺ et fixé sur une cystéine, associé à un accepteur d'électron sacrificiel, le sodium diethyldithiocarbamate (DTC) (Figure I.44b). L'hybride obtenu présente une stabilité améliorée et s'est montré capable, sous irradiation, à 450 nm de catalyser l'hydroxylation de l'acide laurique avec une très bonne activité de plus de 900 TON.

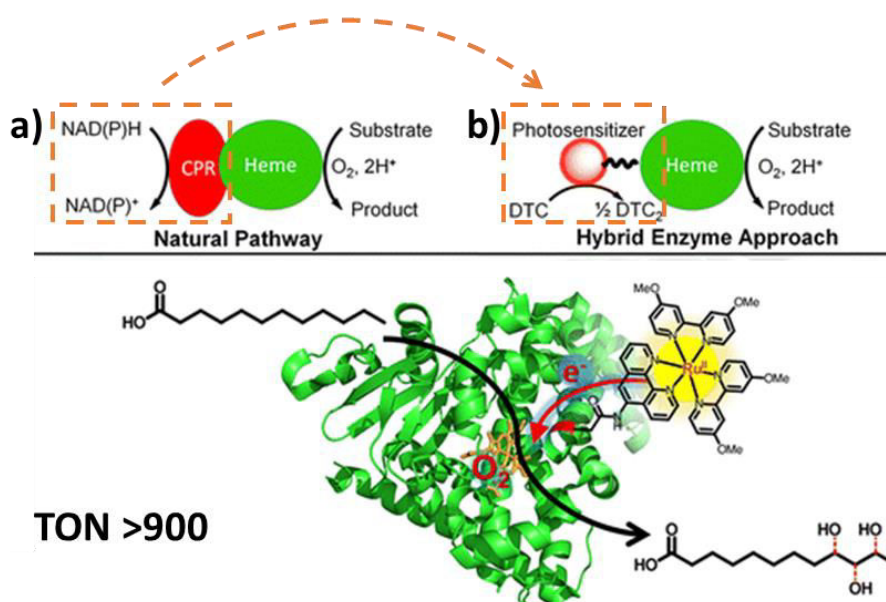


Figure I.44 : Représentation schématique de l'hybride développé par l'équipe de Cheruzel a) système naturel. b) système artificiel avec le DTC comme accepteur d'électron sacrificiel. Reproduit de la réf¹⁰⁷

Cet exemple illustre le potentiel des photobiohybrides et a ouvert la voie au développement de ce type de systèmes. Depuis, diverses métalloenzymes telles que des hydrogénases, des monoxyde de carbone déshydrogénases et des laccases ont été fonctionnalisées par des chromophores à base de ruthénium. Sous irradiation, ces métalloprotéines sont capables de maintenir une activité photocatalytique pour réduire de petites molécules telles que les protons, l'acétylène, le cyanure d'hydrogène et le monoxyde de carbone ou d'activer le dioxygène moléculaire afin de produire des composés hydroxylés.¹⁰⁸

(3) Photoenzymes artificielles composées par d'un catalyseur et d'un photosensibilisateur artificiels

La dernière stratégie concerne le développement complet d'une photoenzyme artificielle en couplant les trois partenaires : une protéine, un catalyseur inorganique et un photosensibilisateur. Très peu d'exemples de tels systèmes ont été décrits dans la littérature.

L'équipe de Ueno a conçu en 2011 une photoréductase artificielle de CO₂ obtenue par greffage de deux complexes métalliques ancrés covalamment sur un nanotube de virus [(gp5βf)₃]₂.¹⁰⁹ Le choix d'une stratégie bioorthogonale a permis de greffer de manière sélective et indépendante les deux complexes sur deux résidus distincts. Le catalyseur de rhénium lieu de la catalyse de réduction du CO₂ en CO est fonctionnalisé par un maléimide pour un ancrage sur les cystéines. Le complexe de ruthénium permettant la réduction du catalyseur après irradiation porte quant à lui une fonction succinimide afin d'être ancrée sur les lysines (Figure I.45). En présence d'un réducteur sacrificiel le 1-benzyl-1,4-nicotinamide (BNAH), la photoenzyme artificielle a été en mesure de réduire le CO₂ en CO, grâce à un transfert d'électrons photoinduit entre les deux partenaires inorganiques.

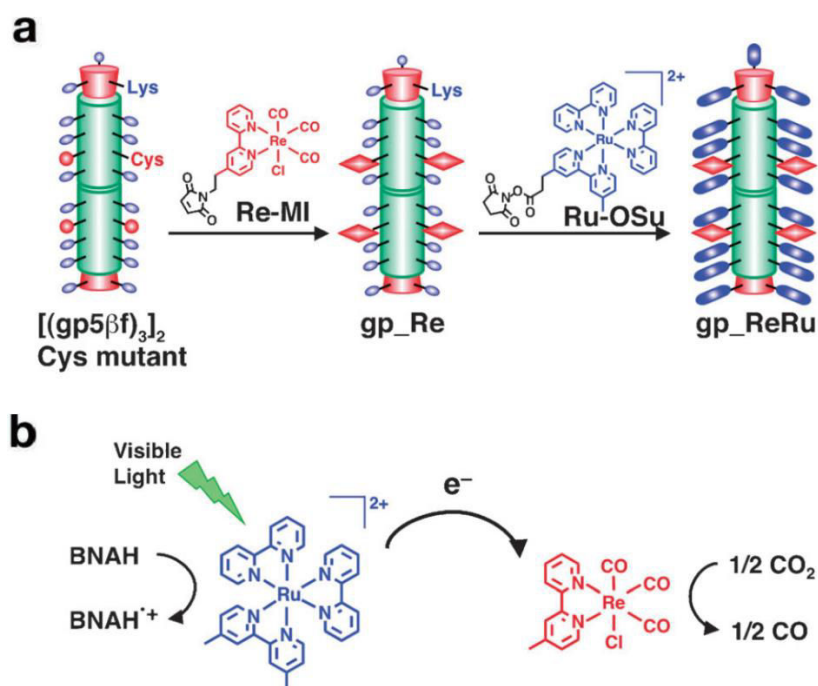


Figure I.45 : Photoréductase artificielle du CO_2 développée par l'équipe de Ueno a) Couplage bioorthogonal des complexes de rhenium et de ruthenium respectivement sur les cystéines et de lysines de $[(gp5\beta f)_3]_2$. b) Schéma de la réduction photocatalytique du CO_2 en CO . Reproduit de la réf¹⁰⁹

Sur le même principe, Shafaat et ses collaborateurs ont récemment développé une photoréductase artificielle du CO_2 par modification de l'azurine, protéine à cuivre qui est un cofacteur (donneur d'électron) de la nitrite réductase (Figure I.46).¹¹⁰ Un chromophore à base de ruthénium a été fixé à l'azurine de manière covalente et sélective sur une cystéine ajoutée par mutation. La seule histidine accessible en surface a été utilisée quant à elle pour incorporer le catalyseur à base de nickel par coordination axiale. L'hybride obtenu s'est avéré être un photocatalyseur hautement efficace et sélectif pour la réduction du CO_2 en CO (Figure I.46).

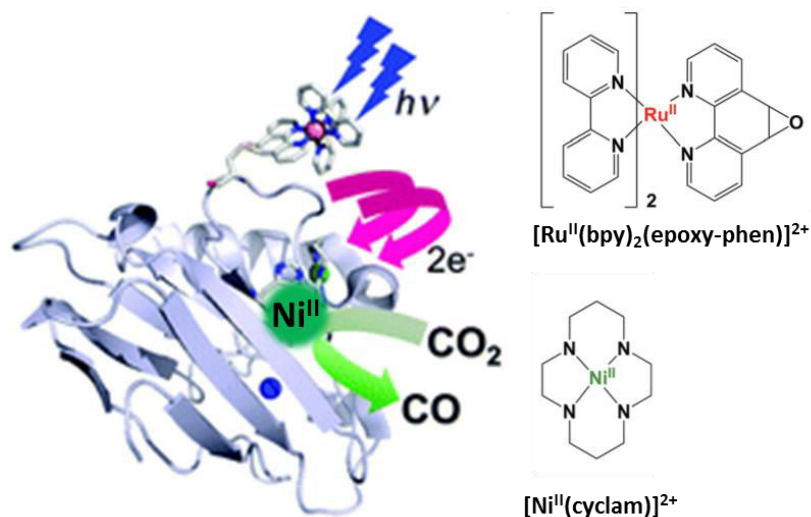


Figure I.46 : Photoréductase artificielle du CO₂ développée par l'équipe de Shafaat et structures des complexes inorganiques utilisés. Inspirée de la Ré¹⁰

Malgré le succès obtenus dans ce domaine de recherche, le développement de photoenzymes artificielles n'est pas une tâche facile. En effet, certains paramètres primordiaux sont à prendre en compte comme l'accessibilité du site actif au substrat ainsi que la distance séparant tous les partenaires RedOx.

En effet, la distance entre tous les partenaires (catalyseur, photosensibilisateur, accepteur ou donneur d'électrons sacrificiels) ne doit pas excéder 10 à 15 Å (à moins de bénéficier de relais) afin de permettre un transfert d'électrons efficace.

c) Photoenzymes artificielles in crystallo

A ce jour, il n'existe qu'un seul exemple de photoenzyme artificielle *in crystallo*. Ce système a été développé par l'équipe de Ueno qui utilise des cristaux de lysozyme de blanc d'œuf de poule réticulé (HEWL) comme supports afin concevoir des photocatalyseurs hétérogènes pour la production de H₂.¹¹¹ L'hybride est composé d'un chromophore, le rose Bengale et d'un catalyseur de production d'H₂ sous forme de nanoparticules de platine (PtNPs). Tous ces partenaires sont immobilisés au sein des canaux de solvant des cristaux de HEWL Figure I.47).

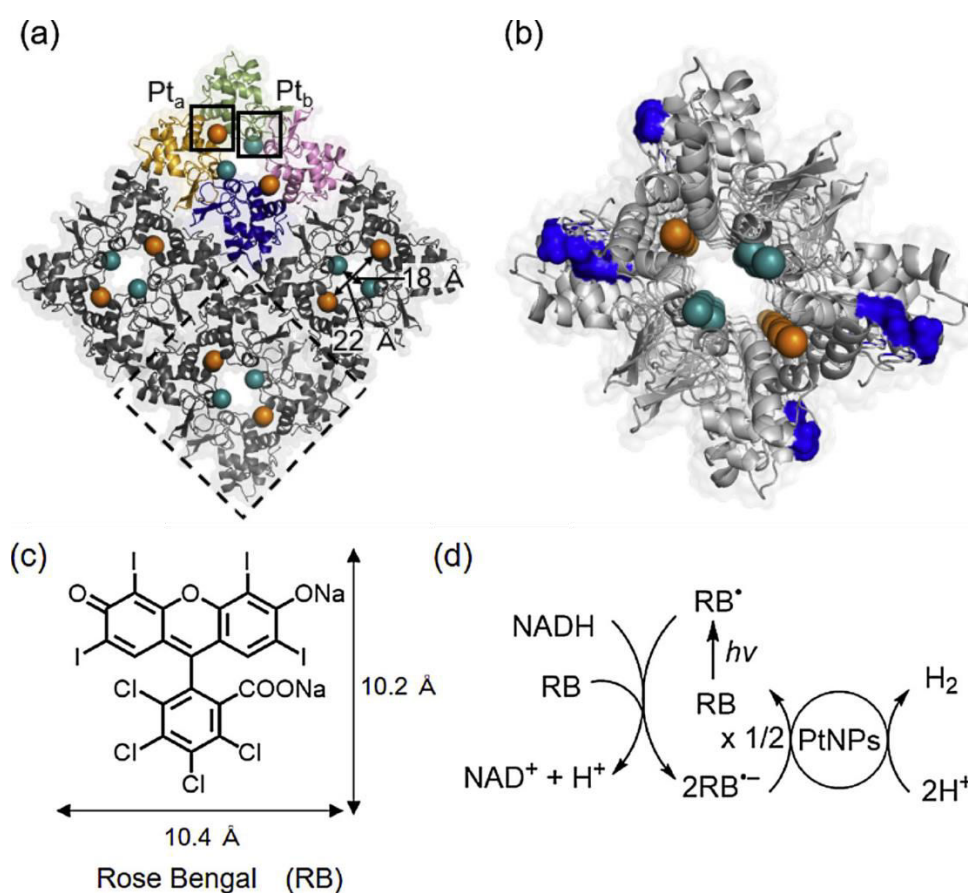


Figure I.47 : (a) La structure globale de l'hybride RB-CL-T-HEWL immobilisant les complexes de chlorure de platine. (b) Agrandissement d'un pore cristallin correspondant au carré en pointillés du (a). (c) Structure chimique du rose bengale (RB). (d) cycle photocatalytique de production du H₂. Reproduit de la réf¹¹¹

Tous ces résultats suggèrent que les cristaux de protéines peuvent être utilisés comme des plateformes prometteuses pour l'insertion de partenaires organiques et inorganiques intervenant dans un processus catalytique.

IV. Immobilisation de protéines

Les enzymes sont reconnues comme étant des catalyseurs exceptionnels tant par leur activité et leurs sélectivités que par leur diversité. C'est pourquoi, elles sont devenues des catalyseurs d'importance dans l'industrie allant de l'alimentaire à la pharmaceutique. Toutefois, l'utilisation d'enzymes natives purifiées dans des applications industrielles reste complexe en raison du coût élevé de production et purification, d'une faible stabilité en conditions non physiologiques et de difficultés de récupération et de réutilisation sur plusieurs cycles de production. L'idée de transformer les enzymes en catalyseurs hétérogènes en les immobilisant sur support permet de s'affranchir de la plupart de ces limitations. L'avantage principal de l'immobilisation est l'amélioration de la stabilité des biomolécules dans diverses conditions réactionnelles. De plus, elle facilite la recyclabilité des enzymes grâce à une séparation plus aisée entre le système biocatalytique et le mélange réactionnel permettant la réalisation de plusieurs cycles catalytiques successifs.

Il existe deux voies principales d'immobilisation des enzymes : la voie chimique (adsorption, la réticulation et la fixation covalente sur support) et la voie physique (inclusion) (Figure I.48).

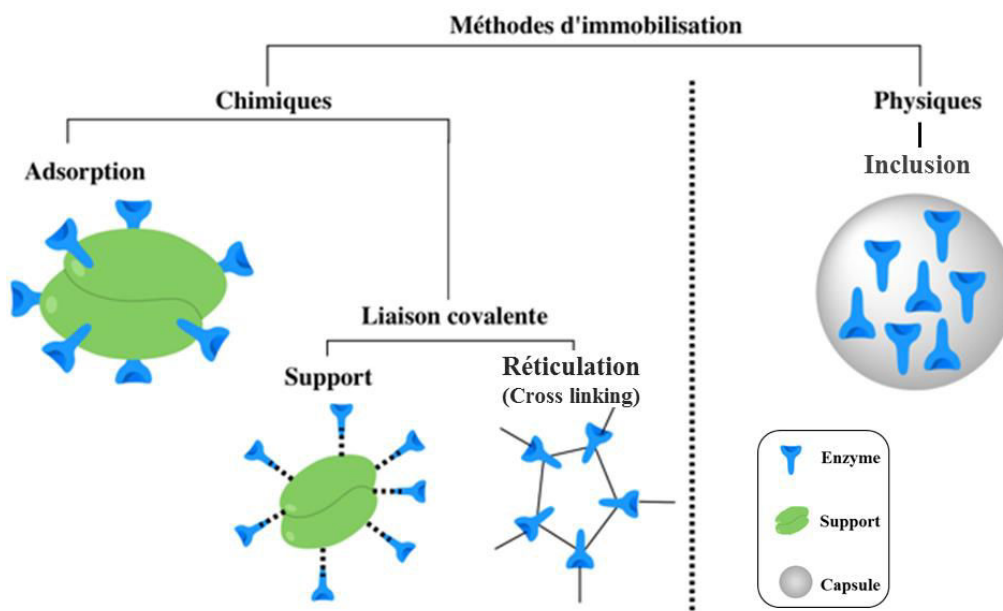


Figure I.48 : les différentes méthodes d'immobilisation d'enzymes

A. Immobilisation sur surface

1. Adsorption

L'adsorption est l'une des techniques d'immobilisation enzymatique la plus utilisée en raison de sa simplicité et de son faible coût. Dans cette méthode, l'enzyme est adsorbée à la surface de matériaux de nature très variée que ce soit du point de vue de la structure chimique ou des propriétés physiques. Les plus répandues sont les résines synthétiques, les biopolymères, les silices, les dérivés du carbone, les zéolithes, le quartz, la cellulose et ses dérivés ou encore les oxydes métalliques...¹¹² Le maintien est assuré par différentes forces telles que des interactions dipôle-dipôle, ioniques, hydrophobes/hydrophiles, de van der Waals et par des liaisons hydrogène.

L'immobilisation est réalisée très simplement en plongeant le support dans la solution enzymatique. Elle ne demande pas de modifications de la protéine et ne diminue généralement pas l'activité de l'enzyme. En revanche, le gain en stabilité n'est généralement pas très élevé et il a été observé que l'enzyme a tendance à se désorber au fur et à mesure des cycles catalytiques.¹¹³

Cette technologie est appliquée à l'échelle industrielle pour l'isomérisation du *D*-glucose en *D*-fructose qui possède un pouvoir sucrant deux fois supérieur au glucose. Cette transformation est réalisée par la glucose isomérase. C'est un marché qui représente une production de l'ordre de 10^7 tonnes/an (Figure I.49). Un des procédés utilisés actuellement, a été développé par la société Genencor/Dupont et repose sur l'adsorption de la glucose isomérase issue de *Streptomyces rubiginosus* sur une résine anionique de cellulose diéthylaminoéthyle. L'enzyme immobilisée s'est révélée particulièrement stable et présente une activité élevée. Elle est en effet capable de convertir plus de 2500 fois sa masse.⁶²

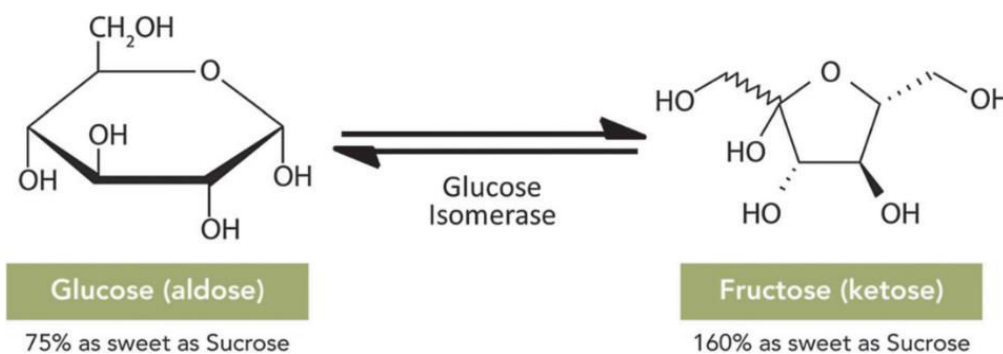


Figure I.49 : Isomérisation du *D*-glucose en *D*-Fructose. Reproduit de la réf⁶²

2. Liaisons covalente

Cette immobilisation repose sur la création d'un lien covalent entre un support préalablement fonctionnalisé et la chaîne latérale de certains acides aminés de l'enzyme tels que les lysines (fonctions amines), les cystéines (fonctions thiols) ou les acides aspartiques et glutamiques (fonctions acides carboxyliques). La liaison covalente ainsi formée est extrêmement stable et empêche tout relargage de l'enzyme dans le milieu réactionnel. Cependant, une baisse de l'activité enzymatique qui s'explique par une dénaturation de l'enzyme (changements conformationnels ou diminution de la mobilité structurelle) est généralement observée.¹¹⁴

L'anhydrase carbonique (AC) est l'une des rares enzymes capable de catalyser l'hydratation du CO₂ en acide carbonique qui est ensuite converti en bicarbonate et ceci avec une cinétique élevée (de l'ordre de 10⁶ s⁻¹) (Figure I.50a).⁶² Devant l'importance de diminuer le taux de CO₂ dans l'air, gaz connu pour son effet de serre important, de nombreuses études décrivent une variété de méthodes d'immobilisation pour l'anhydrase carbonique sur toute sorte de supports tels que des silices, du graphite, des hydrogels ...⁶² Dans l'exemple suivant, l'enzyme a été liée covalamment sur un support poreux en verre ayant un diamètre de pores contrôlés de 38 nm.¹¹⁵ L'enzyme ainsi immobilisée a une activité proche de celle de l'enzyme libre tout en étant beaucoup plus stable à des températures plus élevées nécessaires au procédé. Elle conserve 50% de son activité après 30 jours à 60°C alors que l'enzyme libre est rapidement dégradée (Figure I.50b). De plus l'enzyme immobilisée conserve son activité en présence d'impuretés chimiques présentes dans les gaz de combustion telles que les anions SO₄²⁻, NO₃⁻ et Cl⁻ qui inhibent l'activité de l'enzyme libre.¹¹⁵

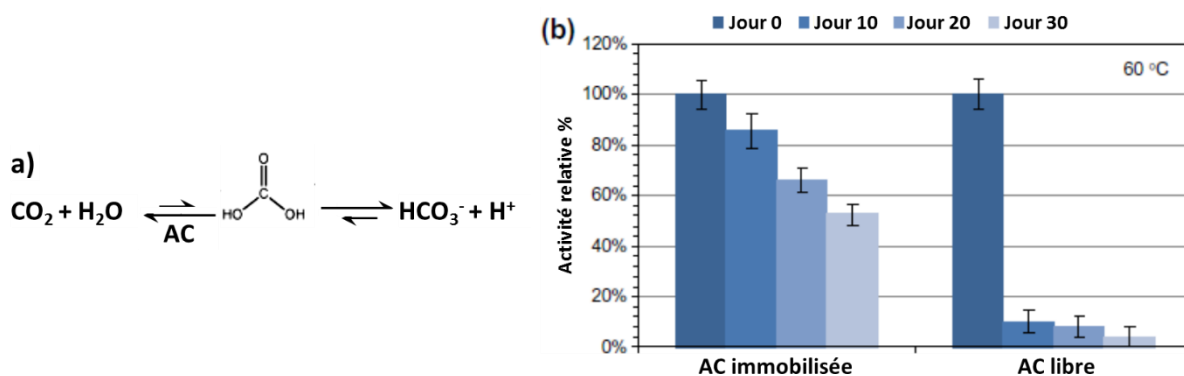


Figure I.50 : a) Hydratation du CO₂ en bicarbonate par l'anhydrase carbonique. Inspirée de la réf⁶² b) Stabilité thermique de l'anhydrase carbonique pour l'hydratation du CO₂ à 60°C. Traduit de la réf¹¹⁵

B. Inclusion

L'immobilisation par inclusion implique que l'enzyme soit piégée au sein d'une microcapsule ou d'un réseau tridimensionnel de polymères généralement composé de matrices organiques (sol-gel de polyacrylamide).¹¹⁶ Des matrices inorganiques comme les silices sont également utilisées.¹¹⁷ L'objectif est de retenir l'enzyme dans le matériau lui fournissant un microenvironnement protecteur tout en permettant la libre circulation des substrats et produits de réaction.

Dans l'industrie agroalimentaire, cette technologie a été appliquée à la désamérisation du jus de fruit. La naringine responsable de l'amertume est dégradée en sucres (rhamnose, glucose et naringénine, composé insipide, grâce à une association d'enzymes l' α -L-ramnosidase et la β -D-glucosidase obtenue à partir de champignons (Figure I.51).¹¹⁸

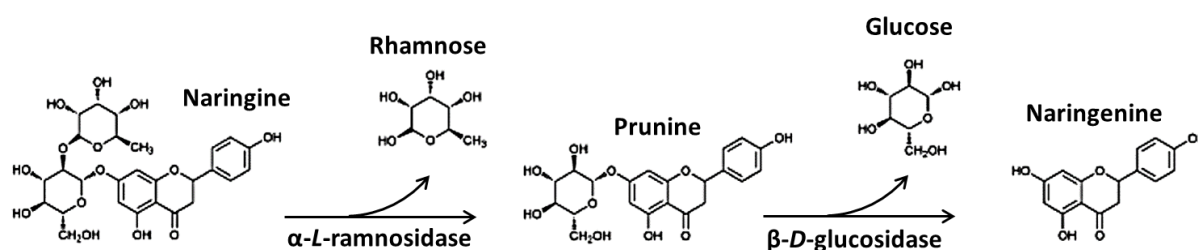


Figure I.51 : Hydrolyse de la naringine en rhamnose, naringénine et glucose par l'association de l' α -L-ramnosidase et de la β -D-glucosidase. Reproduit de la réf¹¹⁸

Ces deux enzymes ont été immobilisées par inclusion dans des billes de cryogels d'alcool polyvinylique (PVA). Bien qu'une activité élevée (92 %) ait été obtenue, une réduction de 64 % de l'activité enzymatique a été observée après seulement trois réutilisations. Cette diminution s'explique par la perte de l'enzyme au cours des différents cycles de lavage.¹¹⁹

L'ajout d'alginate dans le gel a permis de préserver une activité de 70 % après huit réutilisations et a également permis d'augmenter la stabilité lors du stockage. En effet, l'enzyme immobilisée a conservé 90 % de son activité initiale après 6 semaines de stockage. Ce phénomène s'explique par une meilleure affinité entre l'alginate et la protéine ce qui facilite une dispersion plus homogène au sein des billes de PVA.¹²⁰

C. Réticulation

Au début des années 1960, les études approfondies entreprises sur la chimie des protéines ont permis la découverte de la réticulation. Cette technologie s'appuie sur la création de liaisons covalentes entre deux lysines présentes en surface des enzymes *via* un agent de réticulation bifonctionnel (généralement le glutaraldéhyde). Ceci permet de fortement augmenter la stabilité des enzymes en conditions non physiologiques et notamment de les rendre insolubles en milieux aqueux. Il existe deux techniques pour la formulation d'enzymes réticulées (Figure I.52) :

- **La réticulation de cristaux d'enzymes** (CLEC pour Cross-Linked Enzyme crystals).

L'intérêt de cette technique repose sur les propriétés intrinsèques des cristaux de protéines. En effet, l'arrangement spatial régulier et ordonné des monomères ainsi que le fait que 30 à 60 % du volume total du cristal soit occupé par des canaux de solvant permet d'assimiler le cristal de protéines à un matériau poreux.

Cette configuration présente l'avantage de faciliter l'accès des substrats au site actif *via* ces canaux de solvant.¹²¹ Cependant, comme les cristaux de protéines ont tendance à être très fragiles, facilement solubles hors des tampons de cristallisation et sensibles aux variations de température, la réticulation a été utilisée afin d'améliorer leur stabilité mécanique.¹²²

- **La réticulation d'agrégats d'enzymes** (CLEA pour Cross-Linked Enzyme Aggregates).

Il s'agit d'une méthode simple et économique, qui repose sur la précipitation d'enzymes par addition de sels (sulfate d'ammonium) ou de solvants organiques sans entraîner de dénaturation et donc de perte d'activité. Les agrégats ainsi formés sont ensuite stabilisés par ajout d'un agent de réticulation.

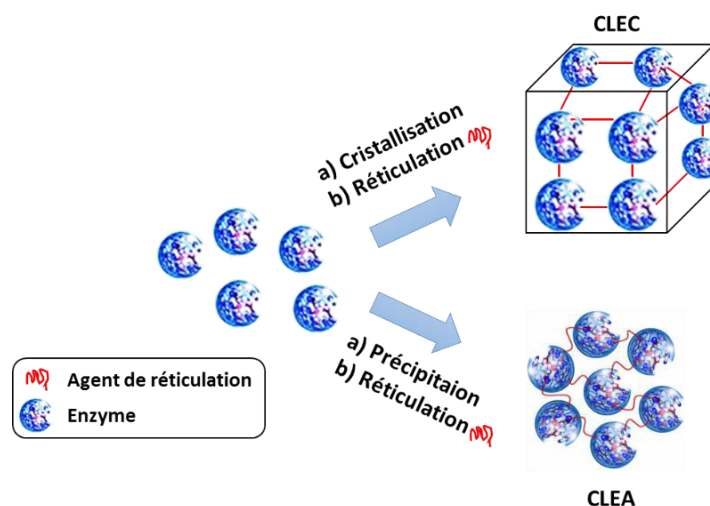


Figure I.52 : Principes de réticulation d'enzymes : CLEA (Cross-Linked Enzymes Aggregates) et CLEC (Cross-Linked Enzyme Crystals).

La réticulation présente de nombreux avantages :

i) Elle ne nécessite pas de support ce qui permet d'une part de diminuer le coût mais aussi d'augmenter la concentration en catalyseur puisque le matériau formé n'est composé que d'enzymes.

ii) Elle augmente la stabilité mécanique car les liaisons covalentes empêchent tout relargage de l'enzyme au cours de la catalyse et permettent également une meilleure résistance vis-à-vis de la température ou des solvants organiques.

iii) Elle facilite le recyclage par des procédés physiques simples tels que la filtration ou la centrifugation.

L'utilisation industrielle de pénicilline G acylase (PGA) est un très bon exemple de l'efficacité d'une telle stratégie. Depuis, depuis les années 60, la PGA est un biocatalyseur industriel majeur utilisé dans la production enzymatique d'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) à partir de la pénicilline G. Le 6-APA est un intermédiaire pour l'hémisynthèse des antibiotiques de la famille des β -lactames tels que l'ampicilline, l'amoxicilline ... (Figure I.53). Actuellement, les antibiotiques issus de cette famille représentent 65 % du marché total des antibiotiques impliquant une production de 6-APA de 20 000 tonnes/an.

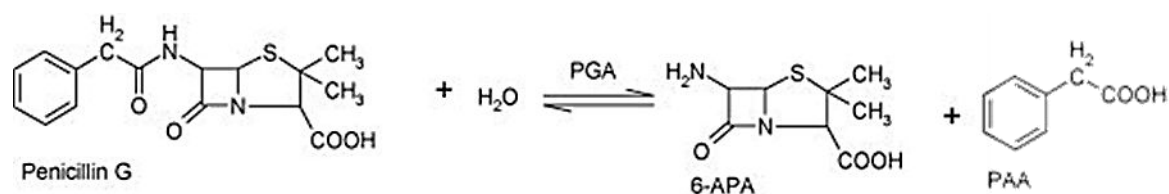


Figure I.53 : Conversion enzymatique de la pénicilline G en 6-APA et acide phényl-acétique(PAA) comme produit secondaire. Reproduit de la réf¹²³

Au cours de ces cinquante dernières années, de nombreuses stratégies d'immobilisation de la PGA ont été développées, brevetées et utilisées dans l'industrie.¹²⁴ Parmi elles, on trouve l'immobilisation sur support de résine acrylamide, de biopolymères, de silice et plus récemment dans les années 2000, l'utilisation des technologies de réticulation avec le développement de CLEC et de CLEA. L'activité enzymatique obtenue pour les enzymes réticulées est proche de celle de l'enzyme libre alors que l'enzyme immobilisée sur support perd environ 80 % de son activité (Figure I.54). Même s'il s'agit d'un cas particulier, cet exemple met en lumière l'efficacité des enzymes réticulées pour une utilisation industrielle à très grande échelle.

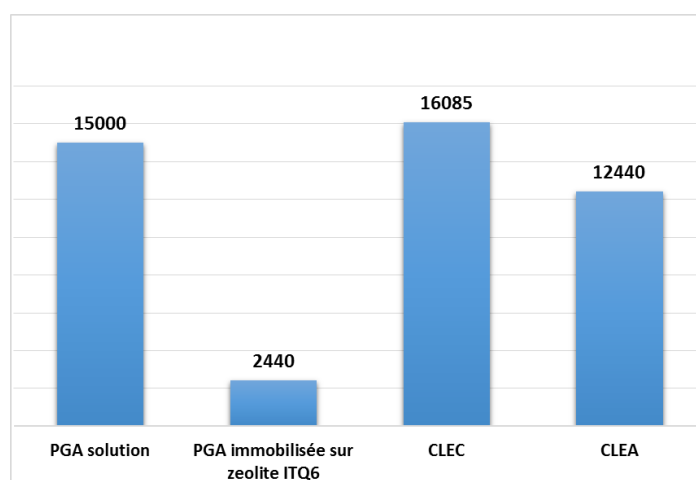


Figure I.54 : Activité enzymatique de la pénicilline G acylase pour l'hydrolyse de la de la pénicilline G en 6-APA. Les activités sont données en unité de PAA produit/g de PGA. Inspirée de la réf¹²⁴

D. Conclusions

L'immobilisation d'enzymes est une stratégie prometteuse qui s'est beaucoup développée au cours de ces dix dernières années. Chaque technique d'immobilisation présente des avantages et des inconvénients que l'on peut tenter de résumer dans le tableau ci-dessous.

La méthode d'immobilisation choisie doit donc être adaptée à l'enzyme utilisée ainsi qu'à l'application visée.

Méthodes d'immobilisation	Avantages	Inconvénients
Adsorption	<ul style="list-style-type: none"> - Economique, simple et rapide - Pas de modification du support ou de l'enzyme - Conformation de l'enzyme intacte - Site actif intact 	<ul style="list-style-type: none"> - Relargage d'enzyme important - Faible concentration en catalyseur - Orientation de l'enzyme aléatoire - Accessibilité au site actif parfois difficile
Liaisons covalentes	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de relargage d'enzyme - Liaisons fortes - Large choix du type de fonctions - Méthodes fiables et documentées 	<ul style="list-style-type: none"> - Mise en œuvre complexe - Fonctionnalisation de la surface - Nécessité d'avoir l'enzyme pure - Réduction de l'activité catalytique
Inclusion & Encapsulation	<ul style="list-style-type: none"> - Simple et économique - Pas de modification de l'enzyme - Activité catalytique conservée - Stabilisation en conditions non physiologiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Mise en œuvre complexe - Relargage important - Difficulté d'accès des substrats
Réticulation (CLEC)	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilisation en conditions non physiologiques - Pas de relargage d'enzyme - Haute concentration en catalyseur - Diffusion facilités des substrats et produits 	<ul style="list-style-type: none"> - Enzyme pure et cristallisable - Processus expérimental complexe - Manipulations compliquées
Réticulation (CLEA)	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode simple - Stabilisation en conditions non physiologiques - Pas de relargage d'enzyme - Haute concentration en catalyseur - Pas besoin d'une enzyme pure - Stabilisation d'enzymes multimériques 	<ul style="list-style-type: none"> - Processus expérimental complexe - Diffusion des substrats et des produits ralentis - Possible modifications conformationnelles

Tableau I.1 : Avantages et inconvénients des différentes méthodes d'immobilisations. Inspirée de la réf¹⁷

CHAPITRE II

PROJET DE THESE

Chapitre II : Projet de thèse

Il s'agit d'un projet collaboratif entre deux équipes, l'une spécialisée dans la (photo)catalyse dans un contexte de chimie verte ainsi que dans le développement de métalloenzymes artificielles pour la catalyse, l'autre sur les régulations transcriptionnelles et épigénétiques qui ont lieu pendant le processus de développement des fleurs.

Depuis maintenant presque une dizaine d'années, l'équipe Bioinspired Chemistry and Environment (BioCE) s'intéresse au développement de photocatalyseurs inorganiques pour l'oxydation de substrats organiques en utilisant des sources d'atomes d'oxygène abondantes, peu chères et non toxiques comme le dioxygène ou l'eau. Un certain nombre de dyades combinant coalement une entité chromophore à base de ruthénium et un partenaire catalytique à base de cuivre ou de ruthénium ont ainsi été synthétisées et utilisées pour l'oxygénation de sulfures et d'alcènes par photoactivation d' O_2 et H_2O respectivement.^{57,58,125} Un exemple est donné dans la Figure II.1. Comme il a été montré dans l'introduction, l'irradiation lumineuse à 450 nm du chromophore initie un transfert d'électron du catalyseur vers un accepteur d'électron sacrificiel générant ainsi une espèce oxydante de type $Ru^{IV}=O$

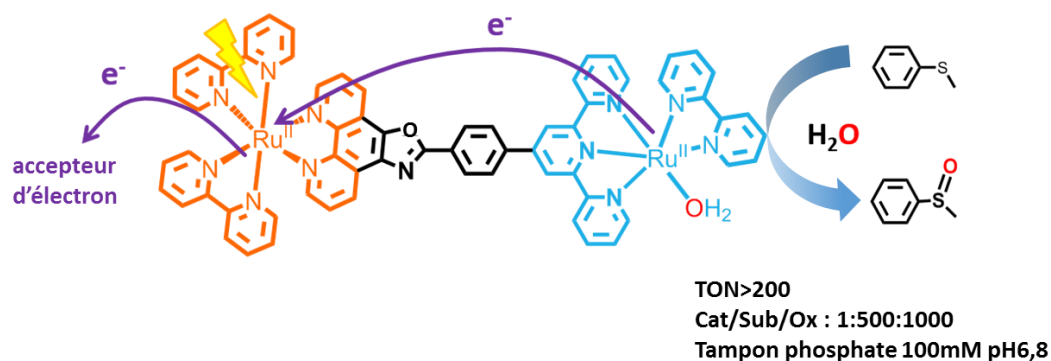


Figure II.1 : Schéma de fonctionnement de la dyade **Ru^{II}Phot-Ru^{II}Cat**.⁵⁷

Par ailleurs, l'équipe BioCE possède également une expertise dans le domaine des métalloenzymes artificielles grâce aux travaux de S. Ménage et C. Marchi-Delapierre.^{82,126,127} Elle a entre autre relaté, l'oxydation catalytique de dérivés de styrène par des CLECs de Nika- FeL_2 capable d'activer le dioxygène en présence de DTT.¹²⁷

L'équipe Régulateur du Développement de la Fleur (RDF) du laboratoire PCV travaille entre autres sur l'étude de la protéine Leafy issue du *Ginkgo Biloba*.¹²⁸ Cette protéine est un facteur de transcription extrêmement important pour les plantes supérieures car elle est impliquée dans le développement des fleurs. Leafy se compose de deux domaines distincts, un domaine de liaison à l'ADN (Figure II.2 - bleu foncé) et un domaine d'oligomérisation en partie N-terminal constitué de 111 acides aminés (Figure II.2- orange).

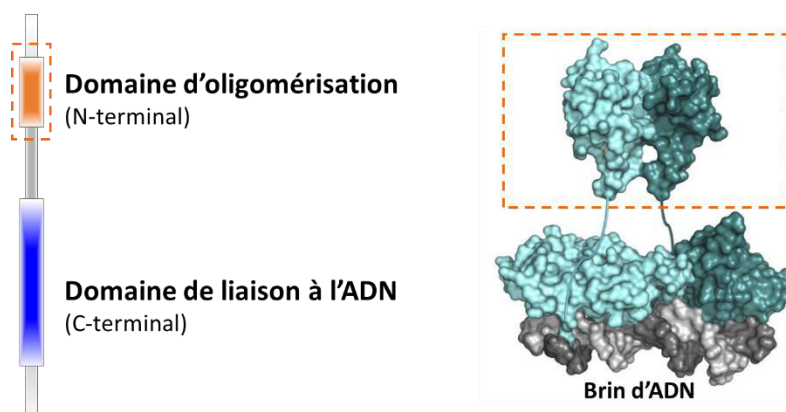


Figure II.2 : fonction de la protéine Leafy. (A gauche organisation des différents domaines protéiques de Leafy, à droite Structure DRX en surface des domaines de la protéine Leafy).

Afin d'étudier précisément la fonction de chaque domaine, de nombreux mutants ont été produits. Parmi eux, les mutants composés uniquement de la partie N-terminale (Leafy N-ter) ont retenu notre attention car leurs cristaux présentent un agencement très particulier formant un réseau de canaux en nid d'abeille (Figure II.3). De plus, leur taille relativement conséquente pouvant atteindre 0,5 mm de long les rends visibles à l'œil nu et fait d'eux des objets relativement facilement manipulables. Les cristaux sont formés par auto-assemblage de monomères en hélice. Celles-ci s'auto-organisent deux à deux pour former un « tube » protéique dans la lumière duquel se trouve une chaîne d'une trentaine d'acides aminés. Cette chaîne, facilement mutable est envisagée comme une plateforme modulable de greffage pour les complexes. Les études en DRX ont permis de réaliser certaines mesures. Ainsi il a été montré qu'un pas d'hélice fait 9 nm et contient 12 monomères. Par ailleurs le diamètre intérieur faisant 5 nm devrait laisser sans aucun doute pénétrer les complexes cibles et les substrats.

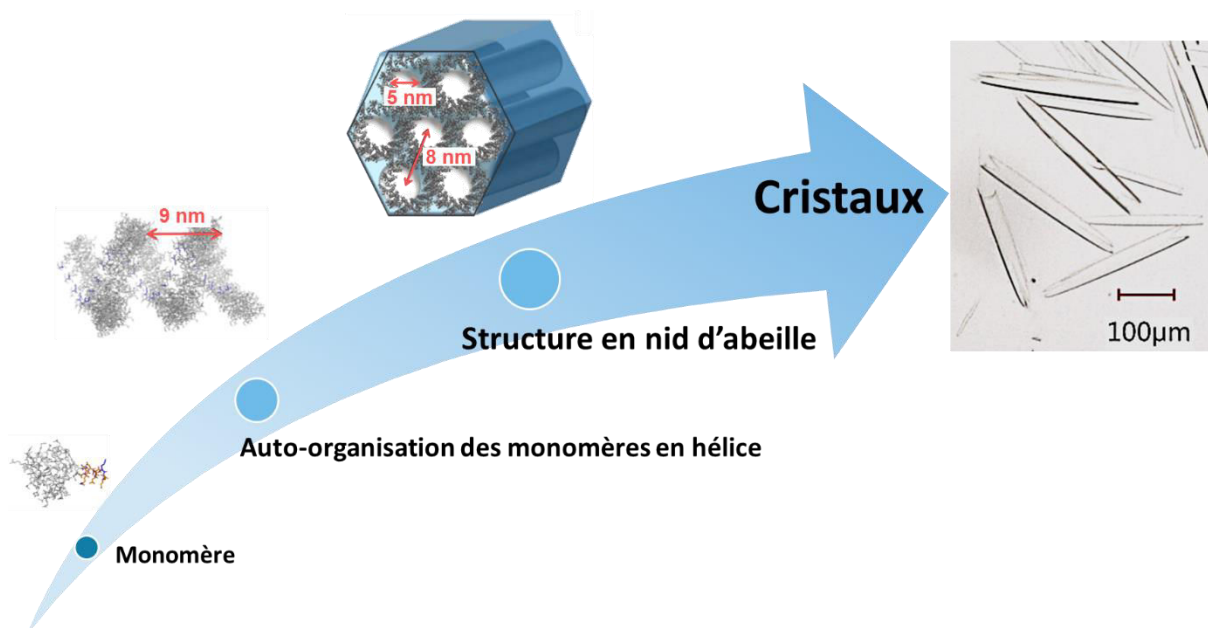


Figure II.3 : Structure des cristaux de Leafy N-ter.

Ainsi, au cours de cette thèse, il était envisagé d'associer les deux thématiques en greffant indépendamment à la fois un chromophore et un catalyseur au sein de la protéine Leafy au lieu d'une dyade afin d'accéder à une nouvelle métalloenzyme artificielle pour la photooxydation asymétrique.

Cette stratégie présente plusieurs avantages. Tout d'abord, l'idée de greffer indépendamment chaque partenaire vient du fait que la synthèse des entités mononucléaires est plus simple et plus rapide que celle nécessaire pour accéder à la dyade. Le second intérêt de cette stratégie réside dans la possibilité de moduler le rapport chromophores/catalyseurs afin de pouvoir bénéficier d'un effet d'antenne (Figure II.4) qui devrait permettre d'augmenter l'efficacité catalytique du matériau biohybride en maximisant l'absorption de photons.

Ensuite, la protéine apporte l'avantage d'un environnement chiral induit d'une part par les acides aminés mais également par la structure hélicale des tubes permettant, nous l'espérons de réaliser des catalyses asymétriques.

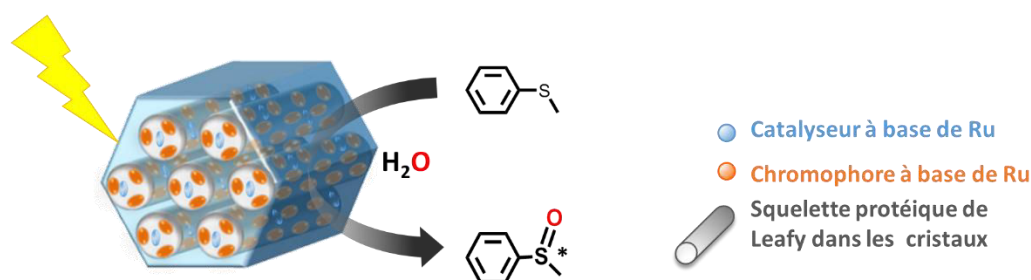


Figure II.4 : Objectifs de la thèse : l'hybride **RuCat/RuPhot-Leafy**.

La stratégie développée repose donc sur l'ancrage indépendant des deux complexes de ruthénium à des distances suffisamment proches pour favoriser le transfert d'électrons. Dans la littérature, pour réaliser de tels ancrages, les acides aminés les plus couramment utilisés sont les acides glutamiques et aspartiques, les lysines et les cystéines.^{85,86,91,129,130}

Le laboratoire PCV possède un certain nombre de mutants de Leafy, dont notamment le mutant **Leafy K84C** qui présente une unique cystéine localisée sur la chaîne de greffage située à l'intérieur du tube. Cet acide aminé a été ciblé pour porter l'entité catalytique (Figure II.5 - bleu). Cette chaîne présente également neuf acides aspartiques et glutamiques qui serviront d'ancrage au chromophore (Figure II.5 - orange). Cette stratégie pourrait permettre ainsi d'avoir neuf fois plus de chromophores que de catalyseurs. Si nécessaire, les quatre lysines peuvent également être exploitées pour le greffage du chromophore (Figure II.5 - rouge).

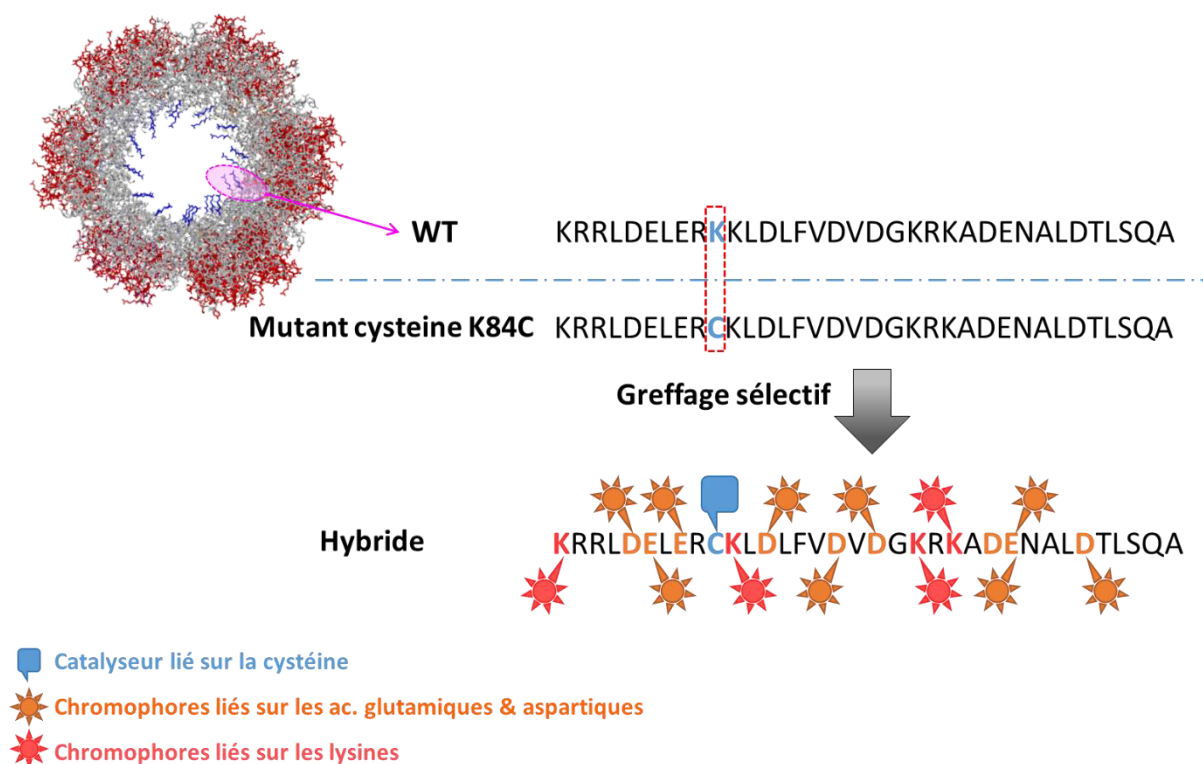


Figure II.5: Stratégies de greffage proposées. En haut à gauche structure DRX montrant la coupe transversale de l'hélice centrale (en gris), des portions des six hélices « proximales » (en rouge) et en bleu le début de l'extrémité C-terminale utilisée pour le greffage des catalyseurs et des chromophores présente dans la lumière mais non observée en DRX en raison de sa structure désordonnée.

Concernant les complexes cibles, ceux-ci sont inspirés de la dyade précédemment présentée (Figure II.1). Le catalyseur sera composé d'un ligand terpyridine et d'un ligand de type bipyridine (ou phénanthroline) coordonnés au ruthénium ainsi que d'une fonction permettant l'ancrage sur la cystéine. Deux stratégies peuvent être envisagées pour son ancrage :

- Fonctionnaliser le ligand terpyridine ce qui permettrait d'éviter la formation d'isomères de configuration puisque le complexe posséderait un plan de symétrie (Figure II.6a).
- Fonctionnaliser le ligand diimine qui présente l'inconvénient de conduire à un mélange de deux isomères de configuration (Figure II.6b).

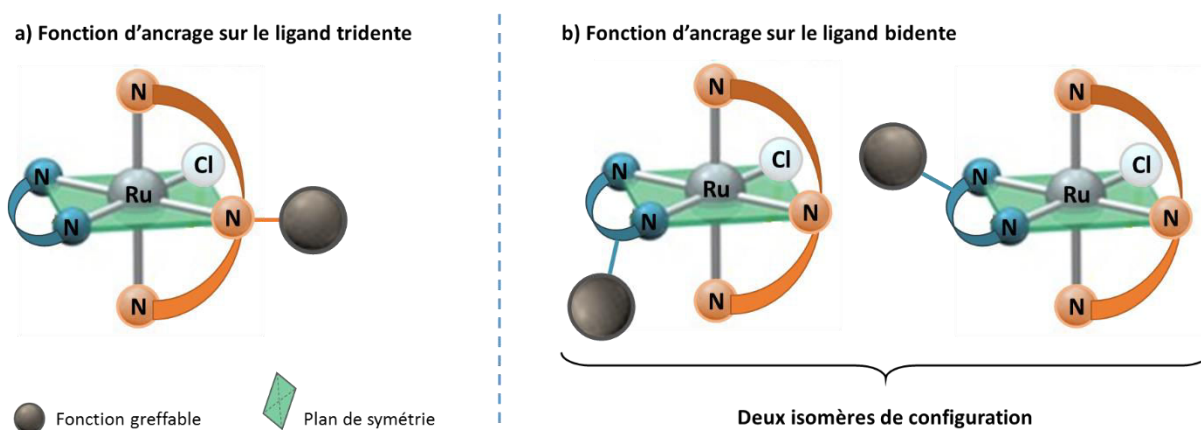
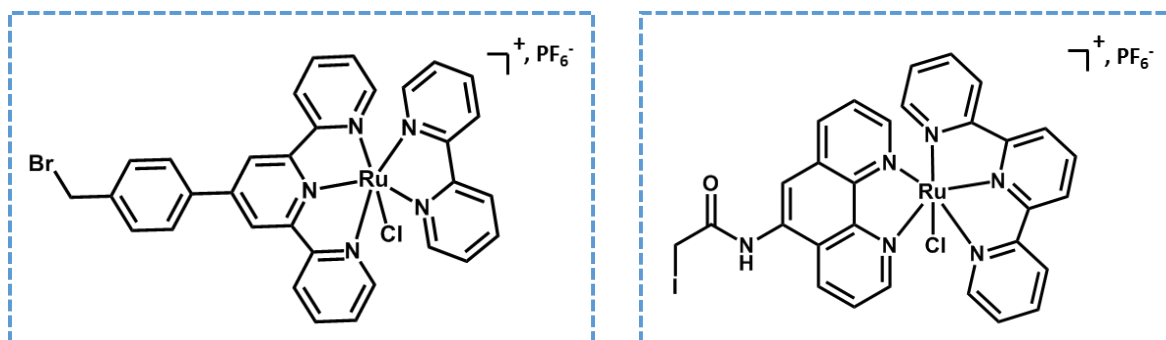


Figure II.6: Différentes possibilités de fonctionnalisation des ligands. a) sur le ligand tridentate et b) sur le ligand bidentate.

Ainsi le catalyseur que nous avons initialement prévu possède une terpyridine fonctionnalisée par un bromure de benzyle (**Br-RuCat**) (Figure II.7 - gauche). Nous verrons qu'en raison de problèmes de synthèse, nous avons dû nous rabattre sur la voie de secours prévue à savoir la fonctionnalisation du ligand bidentate et avons décidé d'introduire une fonction iodoacétamide (**IA-RuCat**) réputée pour sa sélectivité vis-à-vis des cystéines (Figure II.7- droite).

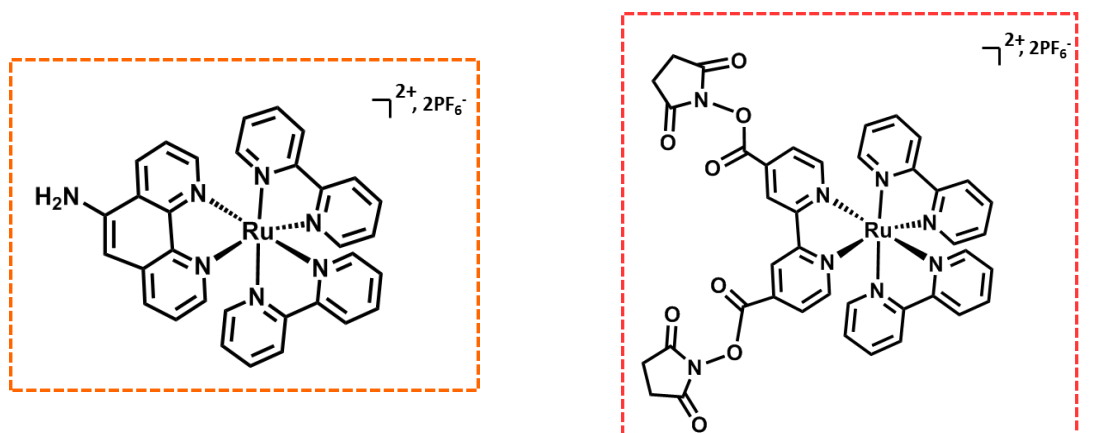


$[Ru^{II}Cl(tpy-Br)(bpy)]PF_6$ (Br-RuCat)

$[Ru^{II}Cl(tpy-Br)(phen-IA)]PF_6$ (IA-RuCat-Cl)

Figure II.7 : Catalyseurs à base de ruthénium choisis pour le développement de l'hybride

Concernant le chromophore, celui-ci est inspiré du prototype $[Ru(bpy)_3]^{2+}$. Ainsi, il présente une coordination classique de type trisdiimine présentant pour le greffage soit une fonction amine (Figure II. 8 - gauche **NH₂-RuPhot**) pour la fixation sur les acides glutamiques et aspartiques soit une fonction ester activée par le N-hydroxysuccinimide (NHS) (Figure II. 8 - droite **NHS-RuPhot**) pour un ancrage sur les lysines.¹⁵



$[Ru^{II}(aminophen)(bpy)_2](PF_6)_2$ (NH₂-RuPhot)

$[Ru^{II}(bpy)_2(NHS-dcbpy)](PF_6)_2$ (NHS-RuPhot)

Figure II. 8 : Chromophore à base de ruthénium choisis pour le développement de l'hybride

CHAPITRE III

RESULTATS & DISCUSSIONS

Chapitre III : Résultats et discussions

La stratégie choisie repose sur l'étude de différents hybrides. Dans un premier temps les deux complexes de ruthénium (**RuCat** ou **RuPhot**) seront greffés indépendamment l'un de l'autre au sein des cristaux de la protéine Leafy conduisant aux hybrides **RuCat**◄**Leafy** et **RuPhot**◄**Leafy**. (Figure III.1a et b). Puis dans un second temps les deux complexes seront greffés conjointement pour accéder au biomatériau **RuCat/RuPhot**◄**Leafy** (Figure III.1c).

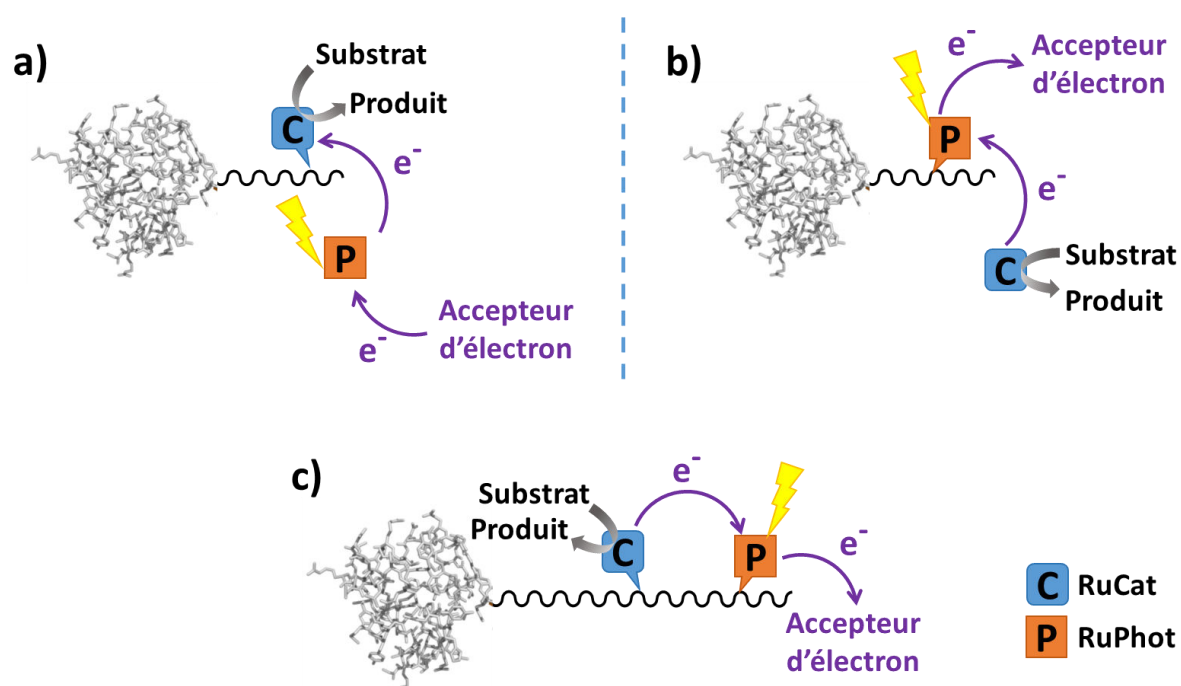


Figure III.1 : Stratégie de développement des photocatalyseurs biohybrides. a) Hybride **RuCat**◄**Leafy**. b) Hybride **RuPhot**◄**Leafy**. c) Hybride **RuCat/RuPhot**◄**Leafy**.

L'intérêt de cette stratégie est de pouvoir étudier les différents paramètres d'importance (conditions de greffage, quantification du ruthénium et de la protéine, caractérisations) de manière plus simple et ainsi acquérir une expertise sur les hybrides avant d'étudier le système complet, plus complexe.

Ces "demi" systèmes permettront également de mettre au point les conditions catalytiques et ainsi de vérifier l'importance d'avoir simultanément au sein de la protéine, les deux complexes pour une activité catalytique optimisée (Figure III.1).

Pour ce projet, nous disposons de la protéine sauvage **Leafy WT** et du mutant **Leafy K84C** dans lequel la lysine 84 a été remplacée par une cystéine; cet acide aminé se situant dans la chaîne localisée dans la lumière des hélices. Il est important de rappeler que cette cystéine introduite par mutation est l'unique cystéine de la protéine.

Le mutant K84C sera utilisé pour les études concernant le complexe **RuCat** et pour l'hybride final contenant les deux complexes.

La protéine WT sera quant à elle dédiée aux études concernant le complexe **RuPhot** mais aussi utilisée comme contrôle négatif lors des études de greffage impliquant le **RuCat**.

I. Préparation des cristaux de Leafy

Pour ce projet, il était nécessaire d'optimiser les conditions de cristallisation afin d'obtenir des "lots" de cristaux les plus reproductibles possibles et contenant des cristaux de taille homogène.

Le processus de cristallisation est extrêmement sensible et très variable d'une protéine à l'autre. Il peut être influencé par de nombreux paramètres tels que la température, l'agent précipitant (nature et concentration), le type de tampon (pH et concentration), mais aussi par les mutations introduites sur la protéine.

Grâce aux études précédemment réalisées au laboratoire PCV, les conditions adéquates ont pu être déterminées. Le tampon de cristallisation initial se composait de 10 mM de TCEP (agent réducteur) afin d'empêcher la formation de ponts disulfures au niveau de la cystéine (uniquement pour **Leafy K84C**), de 25 mM de tampon Tris-HCl à pH 7,2 et de sulfate d'ammonium (SA) comme agent précipitant.¹²⁸ Il avait été montré que le paramètre qui avait la plus grande influence sur la taille et la régularité des cristaux est l'agent précipitant. C'est pourquoi, pour chacune des deux protéines un gradient de concentration en sulfate d'ammonium a été réalisé.

Pour la protéine sauvage, le gradient a été réalisé entre 20 et 520 mM en sulfate d'ammonium. Les cristaux ont ensuite été photographiés et mesurés au microscope afin de montrer l'évolution de leur taille. Il est possible d'observer une corrélation entre la variation de la taille des cristaux et la concentration en SA (Figure III.2), se traduisant par une courbe de forme parabolique (Figure III.3).

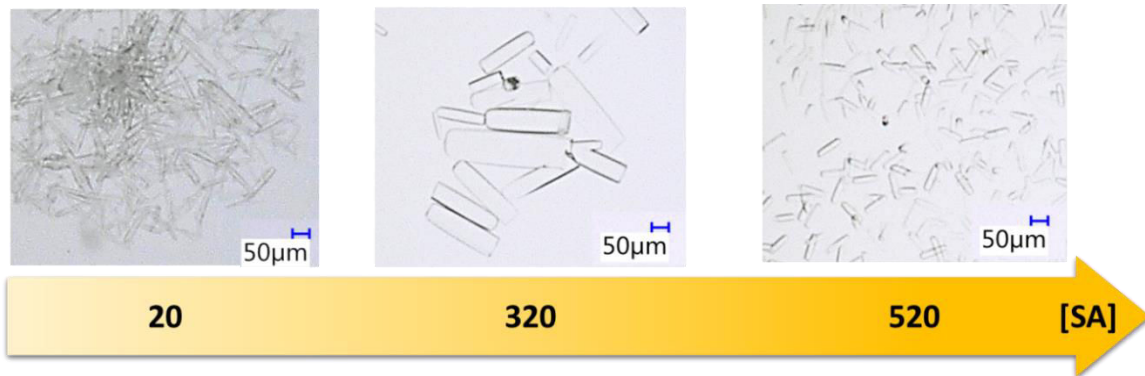


Figure III.2 : Evolution de la taille des cristaux de *leafy WT* avec la concentration en SA.

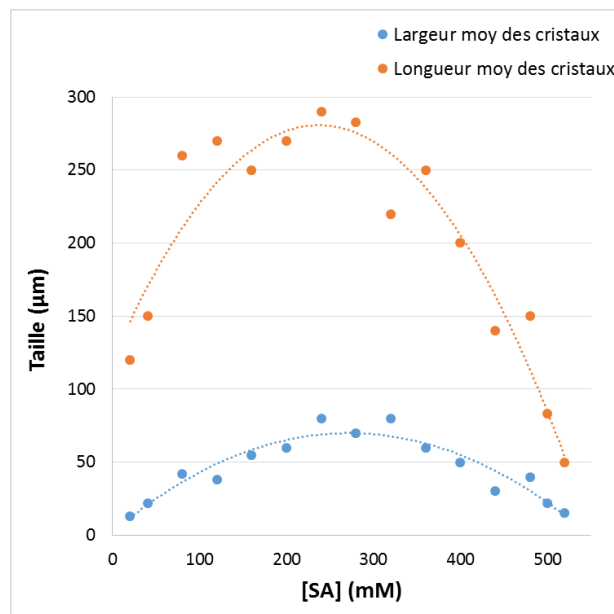


Figure III.3 : Influence de la concentration en sulfate d'ammonium sur la taille des cristaux de *Leafy WT*. Largeur moyenne des cristaux (en bleu). Longueur moyenne des cristaux (en orange).

Cette courbe montre une augmentation de la taille des cristaux (tant au niveau de la longueur que de la largeur) avec la concentration en SA jusqu'à atteindre un maximum aux environs de 250 mM en SA. Au-delà, la taille des cristaux commence à décroître en raison de la hausse de la force ionique induite par l'augmentation de la concentration en SA. La concentration de 320 mM en SA a été choisie pour la suite des études, en raison d'une meilleure homogénéité des cristaux tout en conservant une taille proche du maximum.

La même expérience a été réalisée avec **Leafy K84C**, ou le même phénomène a été observé (Figure III.4). Les cristaux les plus homogènes sont obtenus pour une concentration en SA de 550 mM. Cette condition sera conservée pour la suite du projet.

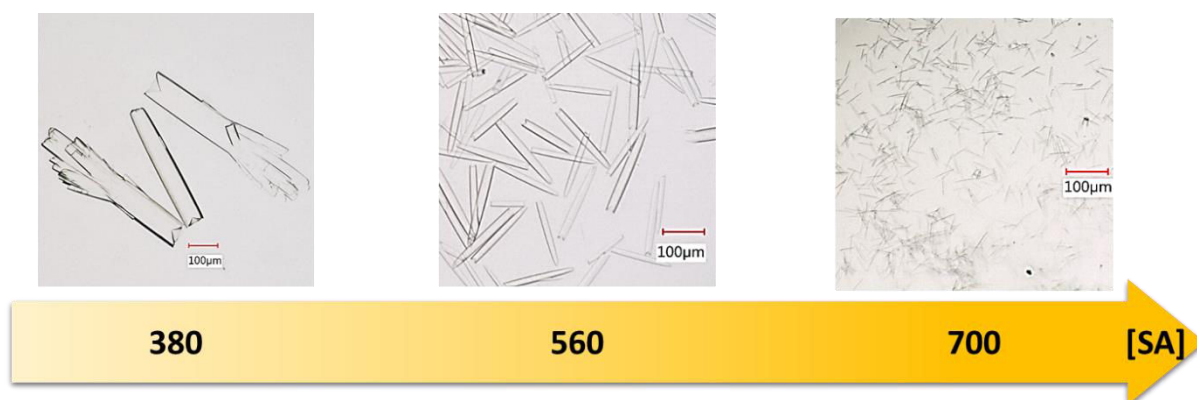


Figure III.4 : Evolution de la taille des cristaux de **Leafy K84C** avec la concentration en SA.

Cette étude pour l'optimisation des conditions de cristallisation a permis de déterminer la concentration optimale en SA pour chacune des deux protéines. Il faut cependant garder en tête que la cristallisation de protéine est un phénomène extrêmement sensible et qu'il est souvent nécessaire de faire de petits ajustements de la concentration en SA.

II. Hybride catalyseur: RuCat-Leafy

A. Synthèse des complexes de ruthénium RuCat

Quel que soit le complexe de ruthénium synthétisé, deux stratégies sont possibles. Soit le ligand permettant l'ancrage est d'abord synthétisé avant d'être complexé au ruthénium (Figure III.5, stratégie 1) soit la fonction d'ancrage est introduite directement sur le complexe lors de la dernière étape (Figure III.5, Stratégie 2).

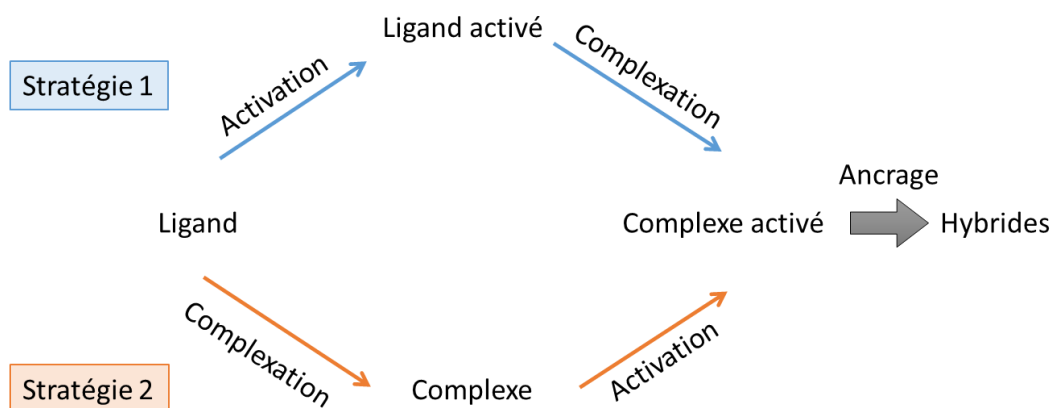


Figure III.5 : Stratégies de synthèse envisageables pour les complexes de ruthénium.

1. Synthèse du catalyseur *Br-RuCat*

Dans un premier temps, il avait été décidé que l'ancrage du complexe de ruthénium à la cystéine se ferait en fonctionnalisant le ligand terpyridine (tpy) afin d'obtenir un complexe parfaitement symétrique et ainsi éviter la présence d'isomères lors du greffage.

Pour cette approche, il a été choisi de suivre la première stratégie (Figure III.5) en synthétisant directement la terpyridine bromée qui sera ensuite complexée au ruthénium (Figure III.6).

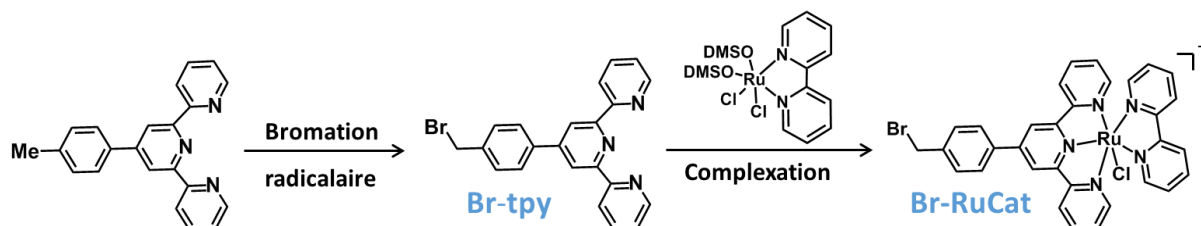


Figure III.6 : Stratégie de synthèse envisagée pour le complexe *Br-RuCat*.

La première étape implique donc la synthèse du ligand **Br-tpy** (Figure III.6). Cependant contrairement à ce qui est indiqué dans la littérature, l'étape de bromation s'est révélée problématique.^{131,132} En effet, quelles que soient les conditions expérimentales utilisées (changement des quantités des différents réactifs, de la température, du solvant, de l'initiateur de radicaux), le composé attendu n'a jamais pu être obtenu sans la formation de produit dibromé très difficilement séparable de l'espèce désirée.¹³³

Afin de pallier cette difficulté, la stratégie a été modifiée. L'approche consistait cette fois à introduire le brome par substitution nucléophile d'un groupe hydroxyle obtenu après une oxydation benzylique suivie d'une réduction de l'aldéhyde obtenu (Figure III.7).¹³⁴

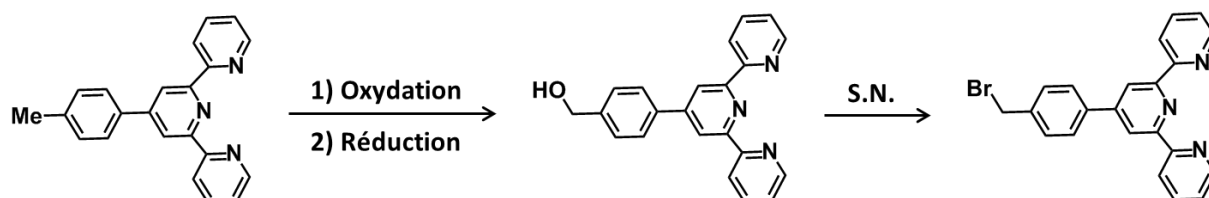


Figure III.7 : Seconde voie de synthèse pour le ligand *Br-tpy*.

Malheureusement, alors que l'oxydation benzylique avec SeO_2 est reconnue pour son efficacité, de façon surprenante, l'aldéhyde intermédiaire n'a pas été observé, probablement en raison de la difficulté à réaliser une oxydation sur ce type de substrat. Une désactivation

de la position benzylique par le groupement pyridinyle pourrait expliquer ceci. Ce résultat a été confirmé récemment par une étude montrant que pas moins de 8h dans un autoclave à 200°C sont nécessaires pour obtenir seulement 20% d'aldéhyde.¹³⁵

Par ailleurs, nous avons cependant pu vérifier après avoir isolé une faible quantité du ligand monobromé grâce à la première approche, que la complexation avec $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}_2(\text{bpy})(\text{DMSO})_2]$ dans les conditions classiques (eau/éthanol) ne pouvait se faire sans substitution du brome par les solvants.¹³⁶ D'autres solvants tels que l'acétone et l'acétate d'éthyle ont été testés mais ils n'ont malheureusement pas permis de solubiliser le complexe.

Devant les trop nombreuses difficultés pour fonctionnaliser la terpyridine, cette approche a été abandonnée au profit de la fonctionnalisation du ligand diimine par des dérivés iodoacétamide.

2. Synthèse du catalyseur IA-RuCat

Afin d'éviter la solvolysse de la partie iodoalkyle par les solvants nucléophiles utilisés classiquement dans les étapes de complexation avec le ruthénium (mélange eau/éthanol), comme cela a été observé précédemment avec **Br-tpy**, nous avons choisi d'introduire cette fonction d'ancrage au dernier moment (Figure III.5).¹³⁷

La synthèse du complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{tpy})(\text{IA-phen})]\text{PF}_6$ (**IA-RuCat-Cl**) repose sur deux étapes de complexation successives avec les ligands d'intérêt et se termine par une étape de fonctionnalisation permettant l'ancrage covalent du complexe sur la cystéine ciblée (Figure III.8).

A partir du RuCl_3 commercial, la complexation du ligand terpyridine est réalisée en utilisant les conditions décrites par T.J. Meyer donnant le complexe $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_3(\text{tpy})]$ de façon quantitative.¹³⁸ L'introduction du ligand aminophénanthroline est ensuite effectuée dans les conditions classiques en présence de triéthylamine et d'un excès de chlorure de lithium avec un rendement de 79 %. L'addition de triéthylamine permet la réduction du Ru^{III} en Ru^{II} et l'excès de chlorure empêche la formation du complexe bis-terpyridine.²³

L'étape de fonctionnalisation de l'amine en iodoacétamide est inspirée de la synthèse décrite par Radford.¹³⁹ La seule modification apportée concerne le changement du solvant

réactionnel, puisqu'en effet l'acétonitrile est connu pour être un bon ligand du ruthénium. Afin d'éviter ce problème, il a été remplacé par le dichlorométhane.

Le complexe **IA-RuCat-Cl** a pu finalement être obtenu avec un rendement total de 49% sous la forme, comme attendu, d'un mélange d'isomères en proportion 1 :1. Il a été caractérisé par différentes techniques spectroscopiques (RMN ^1H et ^{13}C , MS, UV-Visible).

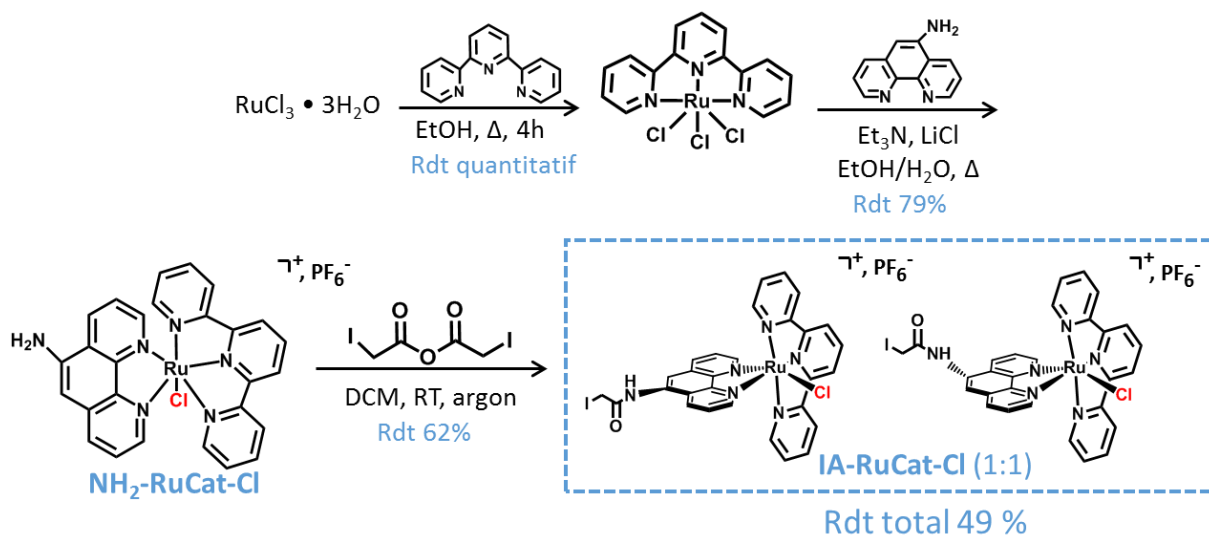


Figure III.8 : Synthèse du complexe **IA-RuCat-Cl** $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{tpy})(\text{IA-phen})]\text{PF}_6^-$.

B. Etudes du greffage de **IA-RuCat-Cl** sur **Leafy K84C**

A ce moment de la thèse, les techniques permettant d'effectuer la quantification absolue du greffage n'ayant pas encore été déterminées, une première approche rapide bien que relative a été d'estimer l'efficacité du greffage de manière visuelle compte tenu de la coloration intense des complexes de ruthénium.

En raison de la faible solubilité du complexe **IA-RuCat-Cl** en milieux aqueux, les premiers tests de greffage ont été réalisés en ajoutant aux 4 μL de la goutte de cristallisation, 2 μL d'une solution 0,8 mM de complexe dans d'acétone. A cette époque la protéine n'ayant pas encore été dosée, cela représentait environ 16 eq de complexe/cystéine, estimation basée sur l'hypothèse qu'environ 50% de la protéine présente dans la goutte a cristallisé, soit environ $195,5 \cdot 10^{-12}$ mol (2,49 μg).

Une coloration rouge intense des cristaux a pu être observée (Figure III.9). Cette couleur perdue après lavage avec de l'acétone et du tampon de cristallisation de **Leafy K84C**, confirmant la fixation irréversible du complexe dans les cristaux.

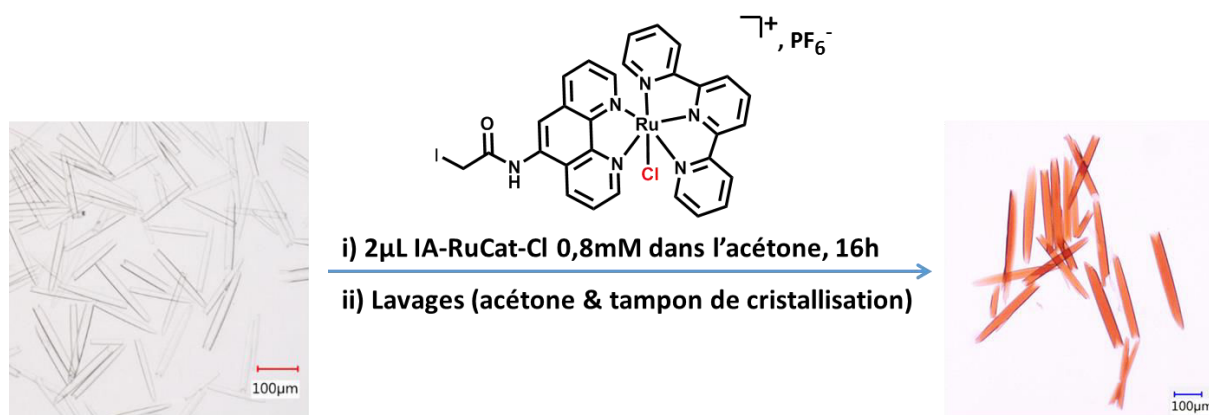


Figure III.9 : Conditions de greffage de IA-RuCat-Cl sur les cristaux de Leafy K84C.

Dans ces conditions, il est apparu que la présence d'une trop grande quantité d'eau entraînait la formation d'une quantité non négligeable de précipité de complexe (Figure III.10). Ceci pose de ce fait la question d'une précipitation éventuelle à l'intérieur des cristaux.

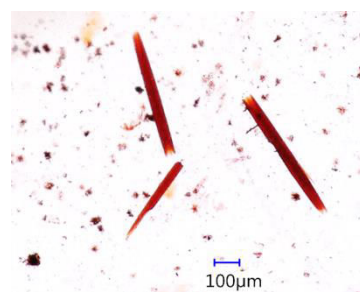


Figure III.10 : Précipité formé lors du greffage de IA-RuCat-Cl dans K84C.

Afin de permettre la solubilisation du complexe en milieu aqueux et éviter l'utilisation de solvant organique, la métathèse du contre ion PF_6^- par NO_3^- a été réalisée. Malheureusement, dans les conditions classiques de la métathèse (colonne de Silice avec élution 10 :90 (KNO_3 aqueux/acétone)), une hydrolyse de la fonction iodoacétamide a été observée.

Par la suite, il a alors été décidé de remplacer l'acétone par du DMSO connu pour sa miscibilité en milieux aqueux et sa bonne compatibilité avec le vivant. Cependant, dans ces conditions (2 μL d'une solution à 0,8 mM en DMSO), une dégradation des cristaux a pu être observée associée à un très faible greffage.

Finalement, un compromis a été trouvé en utilisant une solution à 0,8 mM de complexe dans un mélange DMSO/eau (5/95) (Tableau III.1, colonne 2).

Malheureusement, comme le montre le Tableau III.1, la coloration des cristaux obtenue dans ces conditions s'est avérée bien plus faible que dans les conditions initiales.

Par conséquent afin de maintenir un taux de greffage maximum, nous avons décidé de conserver les conditions utilisées initialement à savoir 2 μL d'une solution à 0,8 mM en complexe dans l'acétone additionnée à la goutte de cristallisation (4 μL). Les précipités sont éliminés par lavage de la goutte à l'acétone.



Tableau III.1 : Influence du solvant de solubilisation du complexe **IA-RuCat-Cl** sur son taux de greffage

1. Influence de la durée d'incubation sur le taux de greffage de IA-RuCat-Cl

Une des premières études réalisées au cours de cette thèse a été la détermination de la durée d'incubation optimale afin d'avoir un taux de greffage maximum. Une fois encore, il s'agissait d'une estimation colorimétrique visuelle.

Dans chaque goutte de cristaux, 2 μL de **IA-RuCat-Cl** à 0,8 mM dans l'acétone ont été ajoutés, puis les cristaux sont laissés incubés pour des durées variables avant d'être rincés plusieurs fois avec de l'acétone puis avec le tampon de cristallisation et enfin photographiés. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

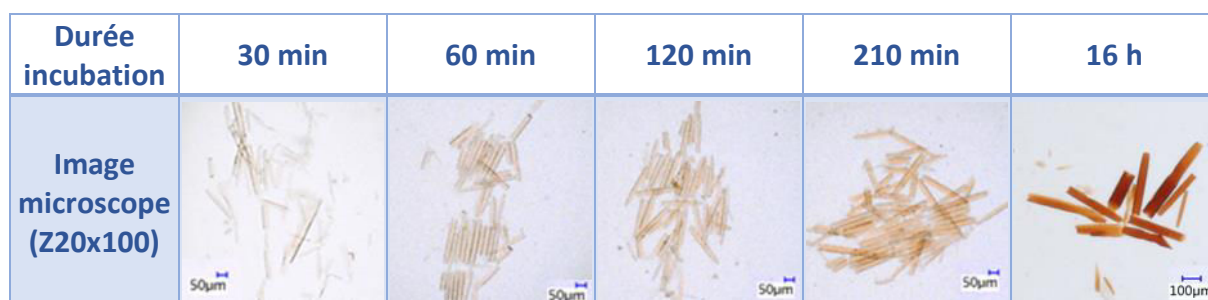


Tableau III.2 : Influence de la durée d'incubation sur le taux de greffage de **IA-RuCat-Cl**.

Comme attendu, un gradient de coloration avec la durée d'incubation a pu être observé avec un maximum atteint après 16 h. La question subsidiaire étant : un temps d'incubation plus long aurait-il pu entraîner une coloration plus intense?

Afin de répondre à cette question, il était dorénavant nécessaire de pouvoir effectuer une quantification précise de la quantité de complexe greffée au sein des cristaux.

2. Quantification du ruthénium et de la protéine au sein des hybrides

La première approche utilisée pour déterminer le taux de greffage des complexes de ruthénium dans les cristaux de Leafy repose sur le développement d'une méthodologie permettant de doser simultanément les quantités de protéine et de ruthénium. Ainsi, nous avons choisi d'introduire du sélénium en référence interne dans la protéine en remplaçant les cinq méthionines présentes dans Leafy par des sélénométhionines.

Cette approche nous aurait permis de doser simultanément par ICP (plasma à couplage inductif) la quantité de ruthénium et de sélénium et donc de pouvoir déterminer rapidement le taux de greffage (nombre de Ru/monomère de protéine).

Leafy WT et **Leafy K84C** ont donc été produites et purifiées dans leurs versions séléniées (**WT-Se** et **K84C-Se**) selon le protocole décrit dans la littérature.¹²⁸

Le remplacement des cinq méthionines par des sélénométhionines a été confirmé par spectrométrie de masse. Cependant un adduit de 175 Da que nous n'avons pas été en mesure d'expliquer a été observé aussi bien chez le **WT-Se** que chez le mutant **K84C-Se**.

De plus, pour le mutant **K84C-Se** les conditions de cristallisations se sont avérées extrêmement difficiles à optimiser. Malgré de nombreux tests, il nous a été impossible d'obtenir des cristaux de taille équivalente à ceux obtenus avec **K84C**. En effet, un précipité a toujours été observé au sein duquel quelques cristaux de plus petites tailles et irréguliers ont été obtenus (Figure III.11).

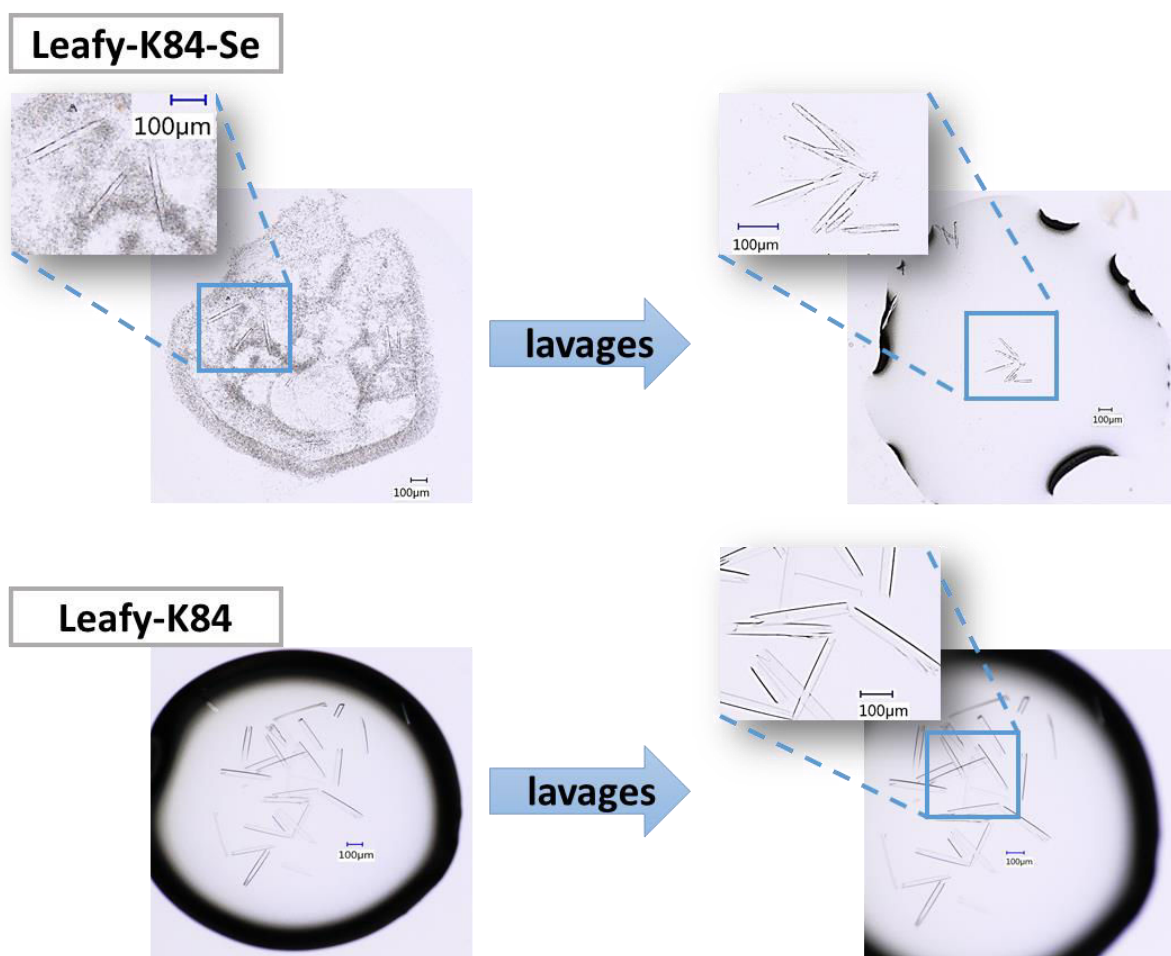


Figure III.11 : Comparaison entre les cristaux obtenus pour **Leafy K84C** et sa version sélénée **K84C-Se**.

Et pour finir, lors du greffage dans les conditions décrites précédemment (2 μL d'une solution à 0,8 mM de **IA-RuCat-Cl** dans l'acétone ajoutés au 4 μL de la goutte de cristallisation), une coloration beaucoup moins intense a pu être observée indiquant clairement un comportement complètement différent entre **Leafy K84C** et **Leafy K84C-Se** lors du greffage.

Ceci a en effet été confirmé grâce à la spectrométrie de masse réalisée sur la protéine **K84C-Se** greffée en solution par **IA-RuCat-Cl** qui montre un taux de greffage de seulement 15 % (Figure III. 12) alors que dans les mêmes conditions la protéine non sélénée présente un taux de greffage de 100 %.

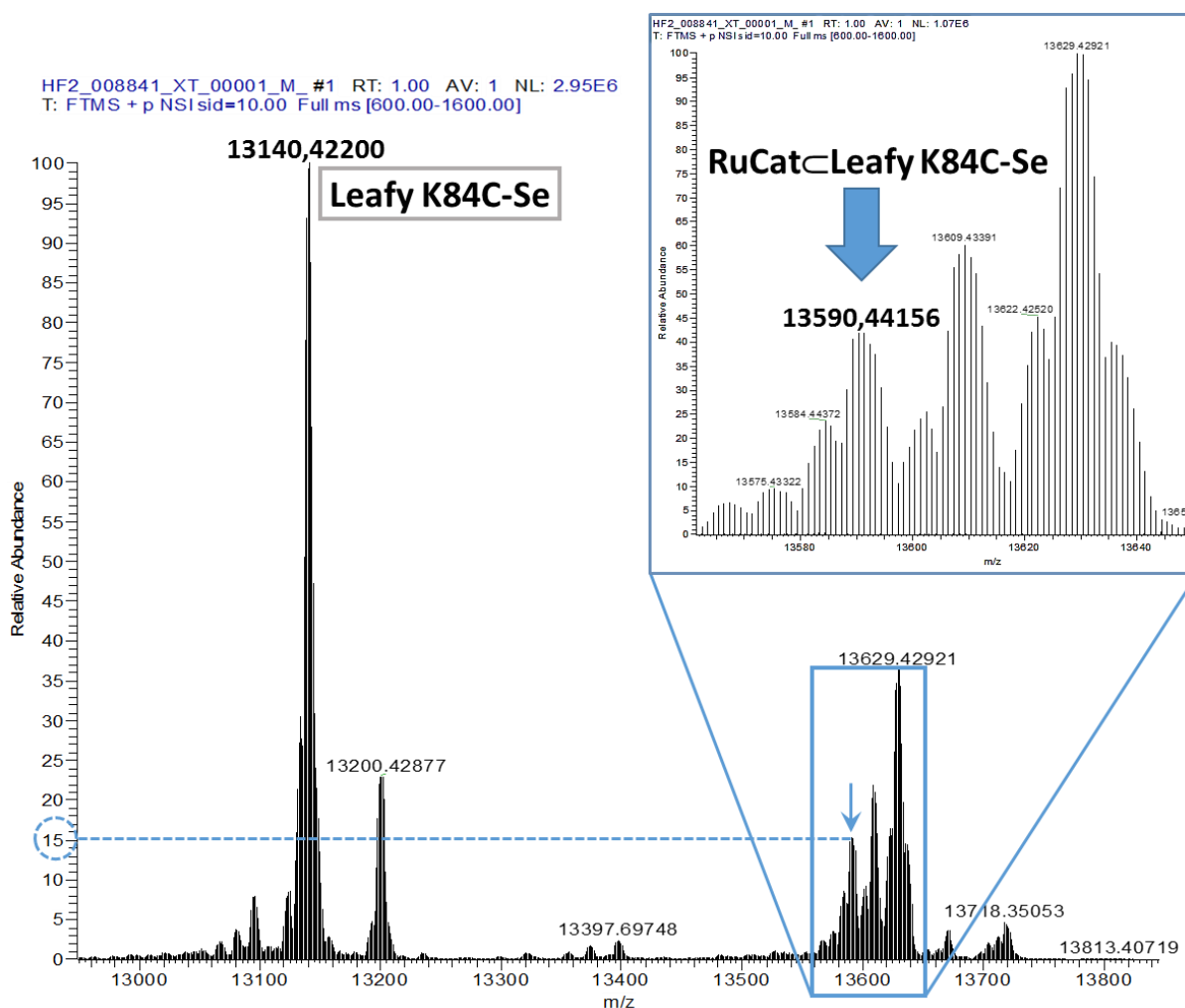


Figure III. 12: Spectre de masse déconvolué de **RuCat-LeafyK84C-Se** greffée en solution. La masse à 13140,42 correspond à **Leafy K84C-Se** et la masse à 13590,44 est attribuée à **Leafy K84C-Se** portant un unique **RuCat**. Les autres masses n'ayant pas pu être attribuées.

Par ailleurs, les mesures réalisées en ICP/MS sur les cristaux de **IA-RuCat-Cl-Leafy K84C-Se** montrent une très grande disparité des valeurs obtenues aussi bien pour le ruthénium que pour le sélénium. Ceci est très probablement dû à la cristallisation très irrégulière de **Leafy K84C-Se** induisant une quantité de ruthénium variable en fonction du lot de cristaux analysés.

Devant les difficultés rencontrées avec la protéine sélénié **Leafy K84C-Se** tant au niveau des conditions de cristallisation que du comportement de greffage vis-à-vis du complexe **RuCat**, il est clair que cette stratégie qui nous semblait très prometteuse ne pouvait en aucun cas être utilisée afin de déterminer le taux de greffage du complexe de ruthénium au sein des cristaux de Leafy.

Par conséquent, nous sommes revenus à une approche plus classique consistant à doser de manière indépendante et par deux techniques différentes le ruthénium et la protéine contenus dans un lot "standard" de goutte de cristallisation.

a) Quantification du ruthénium par ICP

Les quantifications ICP/AES (atomic emission spectrometry) et ICP/MS (spectrométrie de masse) ont été réalisées en collaboration avec les Dr. Julien Pérard et Dr. Stéphane Ravellel respectivement.

Afin de valider la faisabilité et la pertinence de la technique, une expérience test a été réalisée en utilisant différentes quantités de **Leafy K84C** non cristallisée (25, 50 et 100 µg) greffées indépendamment en solution par du complexe **IA-RuCat-Cl**.

Les résultats d'ICP/AES présentés dans le tableau ci-dessous montrent clairement que les valeurs théoriques sont très proches des valeurs mesurées. Par ailleurs, les écarts relatifs obtenus sont acceptables au regard des quantités extrêmement faibles qui sont détectées.

$m_{\text{leafy K84C}}$ (µg)	$m_{\text{Ru théorique}}$ (ng) Calculé pour 1 Ru/Protéine	$m_{\text{Ru mesurée ICP/AES}}$ (ng)	Ecart relatif $ (m_{\text{Ru m}} - m_{\text{Ru th}}) / m_{\text{Ru m}} $
25	197,4	185,4	6,5 %
50	394,8	402,6	1,9 %
100	789,6	731,4	7,9 %

Tableau III.3 : Dosage ICP-AES du ruthénium réalisés après greffage du **IA-RuCat-Cl** sur **Leafy K84C** en solution. * valeur mesurée dans l'échantillon retranchée de la valeur mesurée dans le tampon correspondant à l'ajout dosé.

Ce test nous a permis de valider l'usage de l'ICP pour le dosage du ruthénium au sein des protéines Leafy mais également de valider la stœchiométrie 1:1 lors du greffage du complexe sur la protéine en solution.

Cependant, bien que la technique d'ICP soit extrêmement efficace et précise, elle présente l'inconvénient d'être destructive et assez consommatrice en cristaux (5 gouttes de cristallisation /analyse ICP/AES). Par conséquent, avant d'entamer cette démarche, nous avons voulu voir s'il était possible d'établir une échelle colorimétrique en corrélant l'intensité de coloration des cristaux et la quantité de ruthénium dosée par ICP.

Cette approche nous aurait permis de déterminer d'un "simple coup d'œil" la densité de ruthénium dans chaque lot de cristaux.

Pour mener à bien ce projet, l'utilisation d'un logiciel de traitement d'image (ImageJ) est nécessaire afin d'attribuer une valeur arbitraire à la zone sélectionnée en fonction de l'intensité de coloration et ainsi permettre les comparaisons entre images. Cependant, nous nous sommes rapidement heurtés à quelques difficultés.

La principale était liée à une forte variation de l'intensité de coloration avec différents paramètres expérimentaux tels que l'épaisseur des cristaux, l'épaisseur de la goutte ou encore l'intensité lumineuse du microscope lors des photos.

De plus, la quantité de ruthénium n'étant pas dosée sur un cristal unique mais sur une goutte entière de cristaux, il est difficile de pouvoir corrélérer la valeur obtenue à une zone restreinte de l'image en raison de la variabilité, même faible de la taille des cristaux au sein d'une même goutte. Il est probable qu'avec plus de développement, cette approche puisse fonctionner.

b) Quantification de la protéine par gel d'électrophorèse.

Cette technique relativement simple, consiste à déposer sur gel une gamme d'étalonnage réalisée avec une protéine de référence. Après migration, l'utilisation d'un logiciel de traitement d'image permet d'établir une corrélation entre l'intensité de la bande protéique et la quantité déposée sur gel. Cette droite d'étalonnage est ensuite utilisée pour déterminer la concentration en protéine dans une goutte de cristallisation.

La première tentative a été réalisée en utilisant la BSA comme référence pour réaliser une gamme d'étalonnage en sept points allant de 0,25 µg à 1,75 µg de protéine. Sur le même gel ont été déposés quatre échantillons correspondant chacun aux cristaux resolubilisés issus d'une goutte de cristallisation et provenant de différentes boîtes d'un même lot de cristallisation. Le dosage a été réalisé pour **Leafy WT** et **Leafy K84C**. De manière assez surprenante, les résultats montrent une grande différence de quantité de protéine entre les cristaux de la protéine sauvage et **Leafy K84C** allant du simple au double alors que sur gels l'intensité des bandes entre les deux espèces semble proche (Figure III.13). L'hypothèse permettant d'expliquer cette disparité est une différence de comportement entre la BSA et Leafy vis-à-vis du colorant (bleu de Coomassie) utilisé pour la révélation du gel.

C'est pourquoi, il a été décidé de reproduire le dosage en utilisant cette fois la protéine **Leafy WT** pour la gamme d'étalonnage.

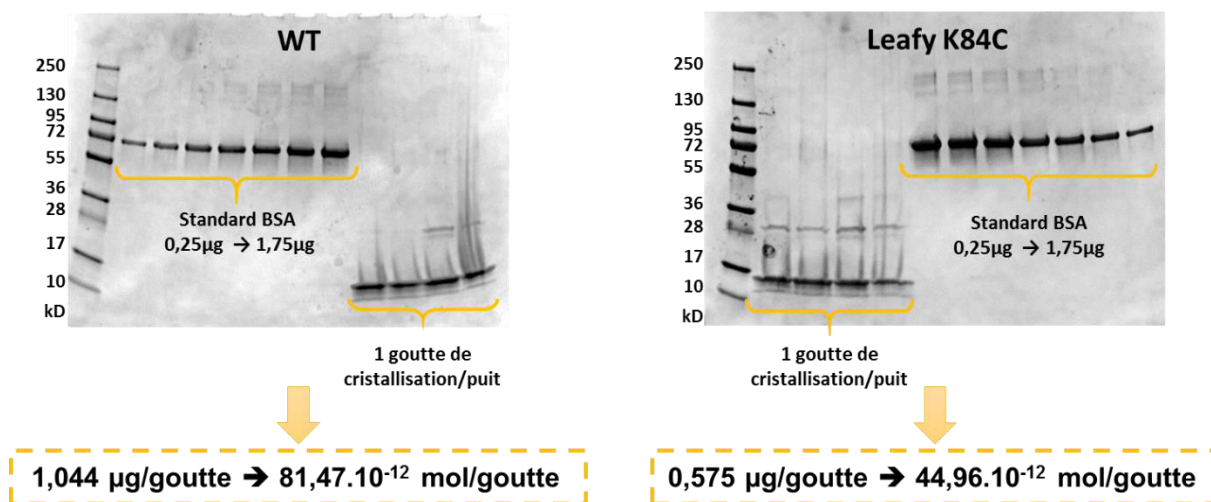


Figure III.13 : Dosage de la quantité de protéine dans les cristaux de **Leafy WT** et de **Leafy K84C** en utilisant la BSA comme référence pour la gamme d'étalonnage.

La protéine **Leafy WT** utilisée pour réaliser la gamme d'étalonnage a préalablement été dosée précisément en utilisant la technique du SEC-MALLS (Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Light Scattering). Cette technique est très consommatrice en protéine, c'est pourquoi elle ne peut être directement utilisée sur des cristaux redissous. En effet, pour une protéine de la taille de Leafy, 100 gouttes de cristaux seraient nécessaires pour une analyse SEC-MALLS. La même expérience que précédemment est réalisée avec une gamme d'étalonnage de 0 à 1,50 µg de **Leafy WT** et le dépôt de quatre échantillons de cristaux (Figure III.14).

Les résultats du dosage donnent des valeurs plus proches pour les deux protéines de l'ordre de 1,36 µg de protéine pour la protéine sauvage et de 1,44 µg de protéine pour le mutant **K84C** par goutte de cristallisation (4 µL). Ces quantités sont deux fois moins importantes que celles attendues (2,49 µg) selon notre hypothèse de départ dans laquelle 50 % de la protéine introduite cristallise.

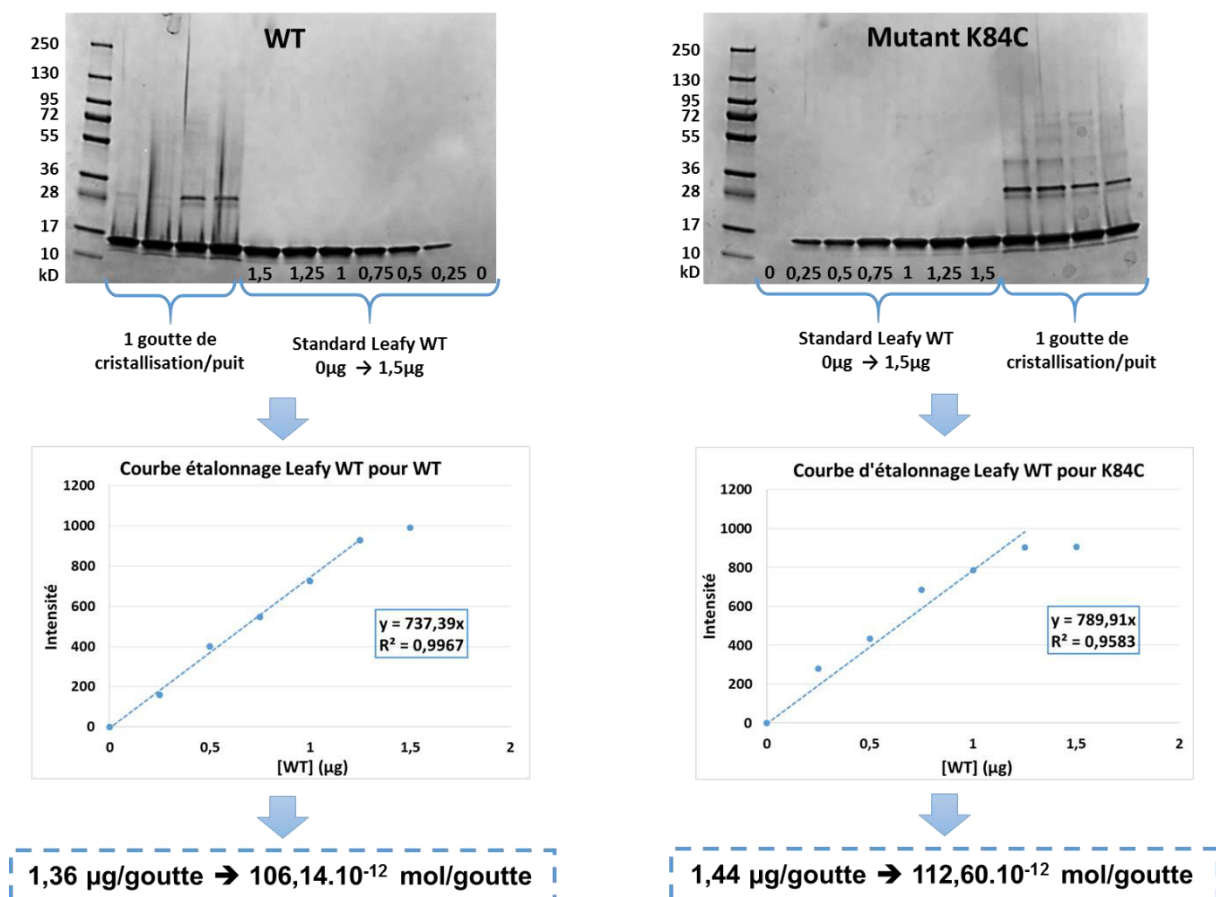


Figure III.14: Dosage de la quantité de protéine dans les cristaux du **WT** et du mutant **K84C** en utilisant **Leafy WT** comme référence pour la gamme d'étalonnage.

Grâce à ces méthodes de dosage (ICP pour le ruthénium et gel d'électrophorèse pour la protéine), il était désormais possible de déterminer l'efficacité du greffage du complexe au sein des cristaux de protéines. Il devenait alors possible de compléter l'étude visuelle réalisée sur l'influence du temps d'incubation (Tableau III.2, p 99) en réalisant une cinétique de greffage de **IA-RuCat-Cl** *in crystallo*.

3. Etude cinétique du greffage du **IA-RuCat-Cl** dans les cristaux de **Leafy K84C**

L'objectif de cette étude est d'obtenir des informations sur la cinétique de la réaction de greffage *in crystallo* afin de déterminer les conditions de greffage optimales. Cette étude a été réalisée en ICP/MS qui consomme jusqu'à cinq fois moins de cristaux que l'ICP/AES avec la même précision. En effet, cette étude réalisée avec l'ICP/AES aurait nécessité 200 gouttes de cristallisation contre 40 par ICP/MS.

Pour cela, sur la base des résultats d'électrophorèse, différentes quantités de ruthénium allant de 1,8 à 14,2 équivalents de ruthénium/cystéine ont été ajoutées aux cristaux du mutant et laissées incuber entre 2 h et 48 h. Les résultats sont présentés dans le graphique ci-dessous (Figure III.15).

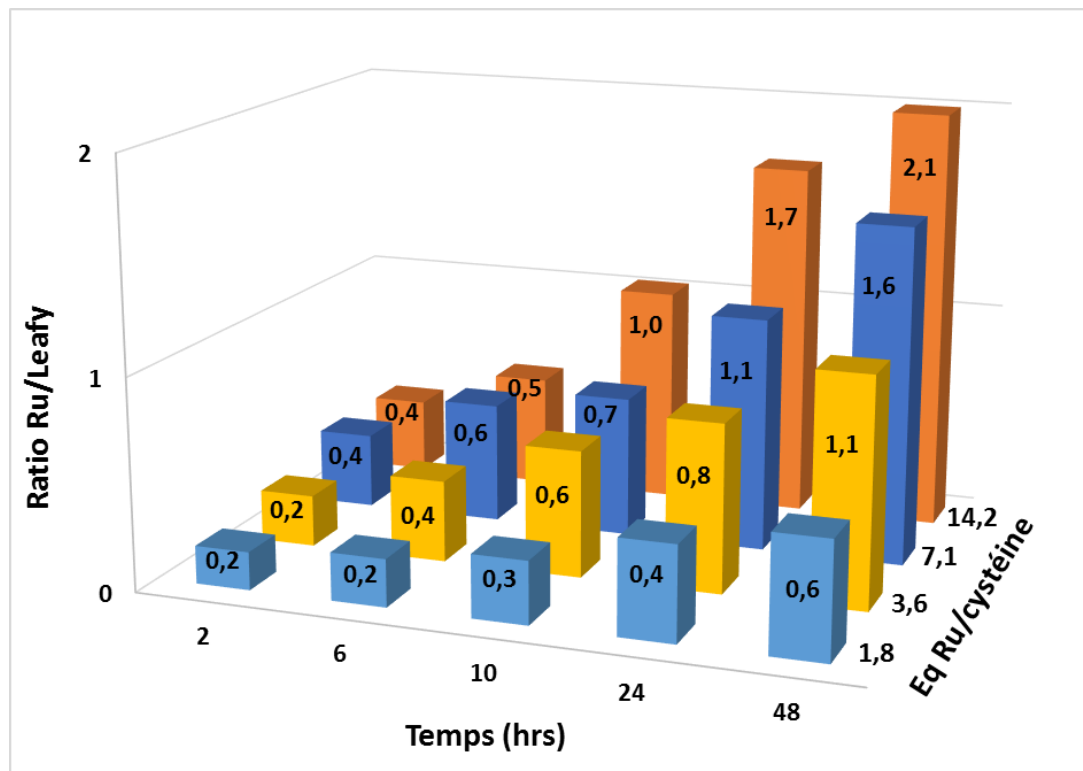


Figure III.15 : Etude cinétique du greffage de **IA-RuCat-Cl** dans les cristaux de **Leafy K84C**.

Comme nous l'avons observé visuellement, la quantité de ruthénium greffée croît avec le temps d'incubation et la quantité de complexe initialement ajoutée à la goutte de cristallisation.

Deux observations peuvent être faites. Tout d'abord, quelles que soient les conditions utilisées, nous avons été surpris de ne pas atteindre de plateaux et ceci même en présence de 14,2 eq et après 48 h d'incubation. Par ailleurs, dans ces dernières conditions, nous avons été étonnés d'observer que deux complexes de ruthénium pouvaient être greffés par protéine alors que cette dernière ne possède qu'une seule cystéine. Ce constat est d'autant plus inattendu que les études menées sur la protéine en solution (8 eq, 16 h) que ce soit lors d'étude en spectrométrie de masse (II.C.3, p118) ou lors de dosage ICP (Tableau III.3) ont toujours montrées une parfaite spécificité lors du greffage du **RuCat** avec une stœchiométrie de 1:1. On peut alors s'interroger sur la quantité maximale de complexe **RuCat** qui pouvant être greffé au sein des cristaux.

Par ailleurs, ce résultat pose également la question de la spécificité du greffage des complexes au sein des cristaux. Afin de déterminer si l'ancrage iodoacétamide est bien spécifique de la cystéine, le suivi cinétique a été réalisé sur les cristaux de **Leafy WT** (dépourvue de cystéine) en présence de 14,2 eq de **IA-RuCat-Cl** par protéine.

Alors qu'aucun greffage n'était attendu, il a été étonnant d'observer une coloration persistante pour **Leafy WT**, bien que plus faible que pour le mutant. Les dosages ICP sont venus confirmer cette observation (Figure III.16). En effet, dans les cristaux de la protéine sauvage après 48h d'incubation, une stœchiométrie de 1 :1 (ruthénium : protéine) a été mesurée attestant d'une fixation aspécifique. Ce qui est d'autant plus surprenant que lorsque le greffage est réalisé sur **Leafy WT** en solution, aucun greffage n'est observé en spectrométrie de masse.

Ces résultats montrent que dans **Leafy K84C**, il est possible d'avoir un greffage qui serait spécifique de la cystéine et un second greffage aspécifique.

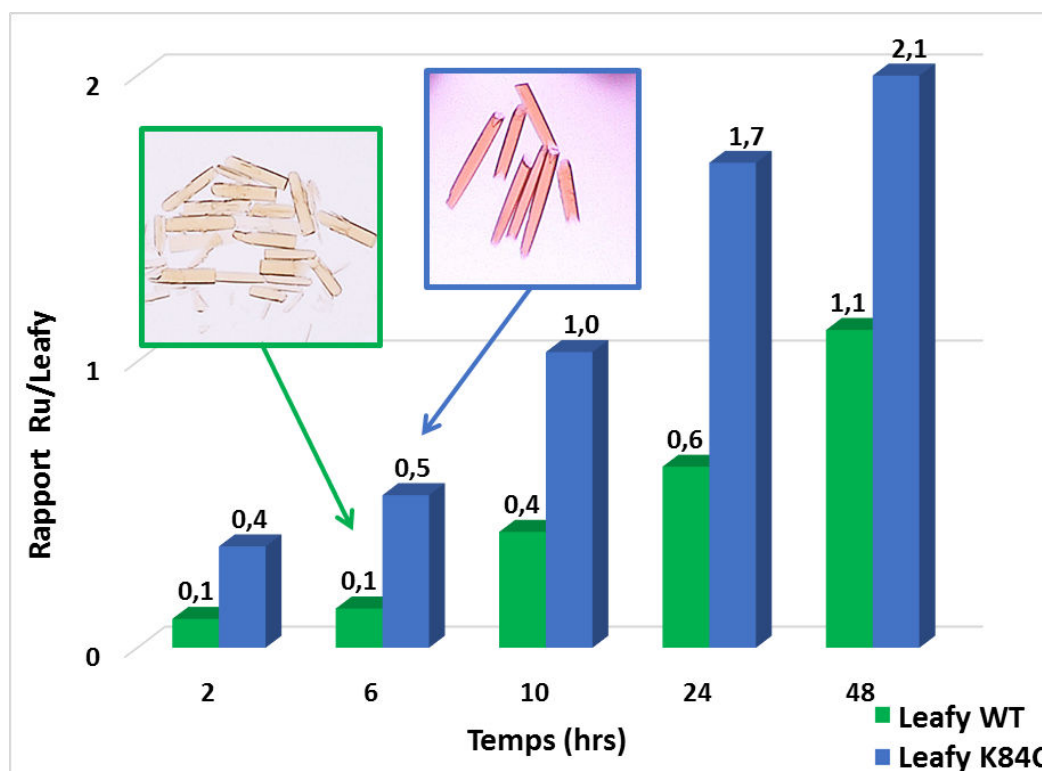


Figure III.16 : Comparaison de la cinétique de greffage de **IA-RuCat-Cl** dans les cristaux de **Leafy WT** & de **Leafy K84C**. Greffage réalisé avec 14,2 eq de complexe **IA-RuCat-Cl** par protéine.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette aspécificité. Tout d'abord, il est connu que le ligand chloro coordonné au ruthénium est relativement labile et peut être aisément substitué par une molécule d'eau ou d'acétonitrile. Ainsi une substitution par la fonction amine d'un résidu lysine, histidine ou arginine n'était pas à exclure.

Pour étudier cette possibilité, nous avons réalisé la même expérience avec le complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{tpy})(\text{NH}_2\text{-phen})]$ (**NH₂-RuCat**) ne présentant pas la fonction iodoacétamide. Comme cela peut être observé dans ce tableau (Tableau III.4), aucune coloration ne persiste après lavage que ce soit pour **Leafy WT** ou pour **Leafy K84C**. Ce résultat indique clairement que la substitution du chloro par un acide aminé n'est pas la raison de l'accroche aspécifique observée.

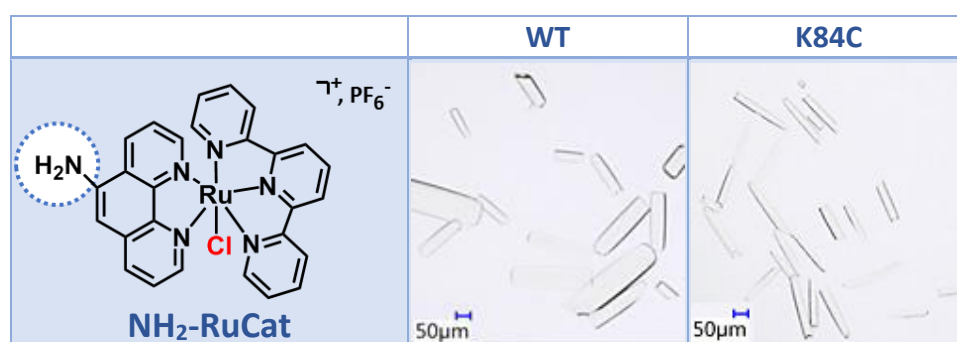


Tableau III.4 : Etude de la spécificité de greffage de **NH₂-RuCat** dans les cristaux de **Leafy WT** et **K84C**.

La seconde hypothèse serait que la fonction iodoacétamide bien que très fréquemment utilisée pour le greffage de molécules sur la cystéine n'est pas aussi spécifique *in crystallo* qu'en solution. En effet certains articles indiquent que les lysines par leurs fonctions amines, bien que moins réactives que les cystéines, peuvent également réagir.¹⁴⁰ Dans la littérature est décrite la possibilité de diminuer la réactivité de ce type de fonction d'ancrage en utilisant par exemple une fonction chloroacétamide au lieu d'une fonction iodoacétamide.¹⁴⁰⁻¹⁴²

Synthèse du complexe de ruthénium **CIA-RuCat-Cl**

La synthèse du complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpy})(\text{CIA-phen})\text{Cl}]\text{NO}_3$ (**CIA-RuCat-Cl**) a donc été entreprise. Elle débute par une étape de fonctionnalisation du ligand par la fonction chloroacétamide et se termine par une étape de complexation avec le de $\text{Ru}^{\text{III}}(\text{terpy})\text{Cl}_3$ (Figure III.17). Le complexe a pu être obtenu mais avec un rendement faible de 2% et sous forme d'un mélange d'isomères en proportion 2:3. Cependant, son optimisation n'était pas une priorité.

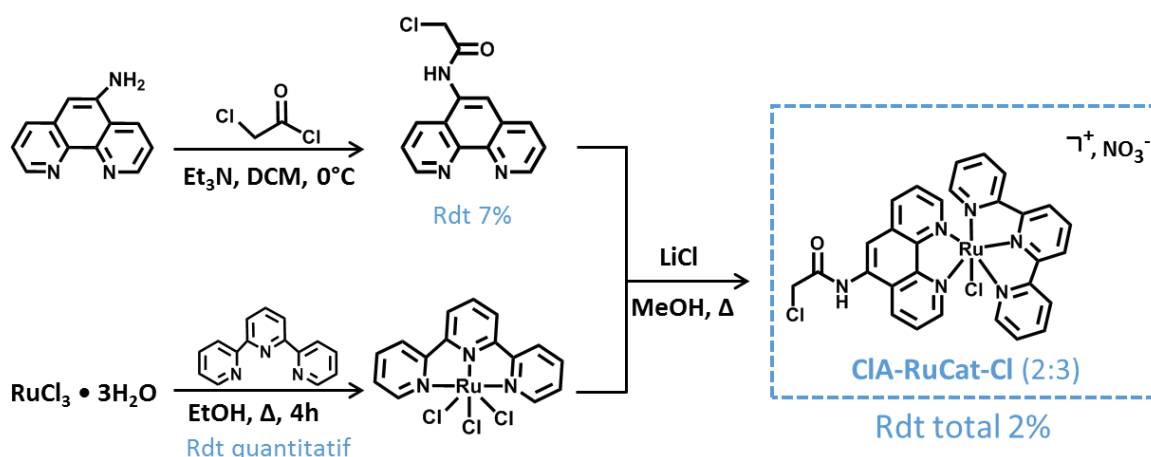


Figure III.17 : Synthèse du complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpy})(\text{CIA-phen})\text{Cl}]\text{NO}_3^-$.

Test greffage du CIA-RuCat-Cl

Le complexe obtenu a ensuite été greffé dans les mêmes conditions que le complexe **IA-RuCat-Cl**, à savoir 2 μL de solution à 0,8 mM dans l'acétone et laissé incubé pendant 16 h et 32 h. Les résultats sont présentés ci-dessous Tableau III.5.

Temps d'incubation	CIA-RuCat-Cl (0,8mM acétone)		IA-RuCat-Cl (0,8mM acétone)	
	16 h	32 h	16 h	32 h
WT				
K84C				

Tableau III.5 : Comparaison *in cristo* des taux de greffage entre **Leafy WT** et **Leafy K84C** greffés par le complexe **CIA-RuCat-Cl** ou le complexe **IA-RuCat-Cl**.

Quel que soit le temps d'incubation, la diminution de la coloration de **Leafy K84C** en rapport du greffage avec la fonction iodoacétamide pointe comme attendu une cinétique plus lente de la fonction chloroacétamide.

Cependant, la présence d'une coloration dans les cristaux de la protéine sauvage indique également que la fonction chloroacétamide n'est pas plus spécifique que la fonction iodoacétamide. C'est pourquoi pour la suite du projet ne sera utilisé que le complexe **IA-RuCat-Cl**.

C. Caractérisation des Hybrides

La caractérisation des hybrides est une étape importante du projet. Elle permet d'avoir une bonne connaissance de l'objet avant son utilisation en catalyse. De plus la localisation des différents partenaires **RuCat** et **RuPhot** dans la protéine pourrait aider à l'interprétation des résultats de catalyse comme par exemple l'éloignement des partenaires pour le transfert d'électrons, l'accessibilité du substrat, l'énantiosélectivité...

1. Diffraction des Rayons X (DRX)

Les études cristallographiques ont été réalisées en collaboration avec le Dr. David Cobessi (IBS).

Une des techniques de choix pour l'étude des cristaux de protéine est la diffraction des rayons X. Cette technique permet d'obtenir la structure de la protéine mais peut par exemple aussi permettre de visualiser des espèces présentes dans le site actif d'une enzyme.

Bien que la structure de leafy ait déjà été résolue, il a été observé que la chaîne d'une trentaine d'acides aminés que nous avons utilisée pour greffer les complexes de ruthénium est trop mobile/désordonnée pour être visible. Il était donc espéré que le greffage des complexes de ruthénium puisse induire une « stabilisation » de cette partie de la protéine et ainsi permettre l'observation des complexes et des résidus impliqués dans le greffage. Malheureusement, ce fut un échec et aucun complexe n'a pu être observé dans les cristaux.

Dans l'objectif d'obtenir une structure de leafy contenant le complexe **RuCat**, une solution de la protéine préalablement fonctionnalisée par **IA-RuCat** a été envoyée au robot de cristallisation. Cependant malgré plus de 900 conditions testées, il n'a pas été possible d'obtenir de cristaux. L'hypothèse la plus vraisemblable serait que l'encombrement stérique généré par le complexe empêche toute cristallisation de la protéine.

2. Etudes spectroscopiques in crystallo

Les études spectroscopiques *in crystallo* sur **Leafy K84C** ont été réalisées au laboratoire icOS de l'ESRF de Grenoble en collaboration avec le Dr. Philippe Carpentier (LCBM).

a) Spectroscopie UV-Visible in crystallo

Les objectifs de cette étude étaient d'une part de vérifier l'intégrité du complexe après greffage dans les cristaux tout en obtenant des informations sur la sphère de coordination du complexe de ruthénium.

Les spectres UV-visible des solutions et des hybrides ont été enregistrés et seule la zone entre 350 et 650 nm correspondant à la MLCT du complexe a été sélectionnée (Figure III.18).

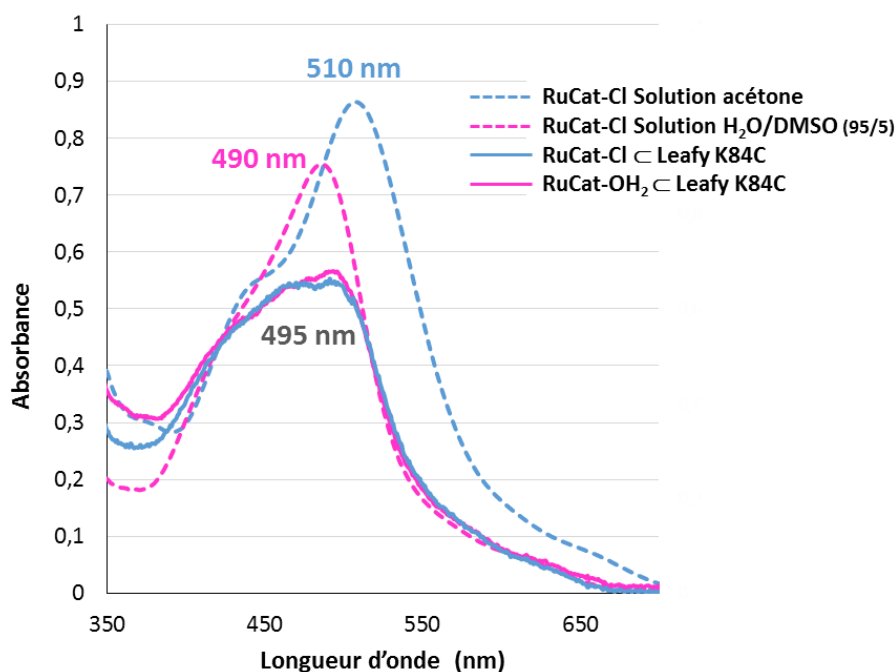


Figure III.18 : Spectre UV-Visible de IA-RuCat \subset LeafyK84C

Tout d'abord, il a été surprenant d'observer une différence significative entre les spectres IA-RuCat-Cl lorsque celui-ci est mis en solution dans l'acétone (Figure III.18, spectre pointillé bleu) ou en solution dans un mélange eau/DMSO (95/5) (Figure III.18, spectre pointillé rose). Alors que dans l'acétone un λ_{\max} à 510 nm a été observé, un déplacement à une énergie plus élevée (λ_{\max} à 490 nm) est observé dans le mélange aqueux.

En se basant sur les données de la littérature^{23,143}, il est fort probable qu'une substitution du chloro par une molécule d'eau se soit produite dans ces conditions. Notons cependant qu'il est surprenant qu'une telle substitution se soit produite dans des conditions aussi douces alors qu'en général cela nécessite l'utilisation soit de sels d'argent en solution aqueuse à reflux, soit de conditions acides.¹⁴³

Ensuite, les spectres ont été enregistrés sur les cristaux obtenus d'une part à partir du **RuCat-Cl** (Figure III.18, spectre trait plein bleu) dans l'acétone et d'autre part de l'espèce **RuCat-H₂O** issu de **IA-RuCat-Cl** (Figure III.18, spectre trait plein rose), obtenue dans le mélange H₂O/DMSO. Ceux-ci se sont avérés identiques avec un λ_{max} à 495 nm indiquant que, lors du greffage de **RuCat-Cl** dans les cristaux en raison de la présence inévitable d'eau, une substitution Cl/H₂O s'opère.

Il est également à noter que l'allure générale des spectres obtenus *in crystallo* présente un élargissement important. Ceci pourrait s'expliquer soit par une moins bonne résolution due au fait que nous travaillons avec des cristaux, soit par la présence de plusieurs espèces ayant un environnement électronique différent à l'intérieur des cristaux. Cette dernière hypothèse n'est pas à exclure étant donné que, rappelons-le, un complexe supplémentaire est présent en raison d'un ancrage aspécifique (voir les résultats ICP, Figure III.15, p107).

b) Spectroscopie Raman à résonance *in crystallo*

La spectroscopie Raman fournit des informations précises sur la nature des liaisons chimiques dans un matériau. En effet, les fréquences des modes de vibration caractéristiques des liaisons étudiées sont sensibles à leur environnement local.

En raison des nombreuses liaisons chimiques presque identiques qui les composent, les spectres Raman des molécules biologiques sont en général difficiles à interpréter. Cependant, lorsqu'une de ces liaisons implique un métal, la fréquence de vibration associée est alors facilement identifiable.

Sur cette base, les études par spectroscopie Raman du complexe de ruthénium **RuCat** greffé dans les cristaux de la protéine **Leafy** avaient pour objet de fournir des informations concernant les modifications induites par le greffage du complexe dans les cristaux de **Leafy K84C**, en particulier, celles observables dans la sphère de coordination de l'atome de ruthénium mais également celles des résidus impliqués dans la fixation du complexe à la

protéine. De plus, des mesures réalisées en spectroscopie UV-visible *in crystallo* (Figure III.18) semblaient indiquer, lors du greffage de **RuCat**, une substitution du ligand chloro par une molécule d'eau. Nous souhaitons donc voir s'il était possible d'obtenir des données de spectroscopie Raman confirmant ce processus. D'autre part, nous esperions aussi que cette technique puisse nous permettre de déterminer la sélectivité du greffage entre **RuCat** et la seule cystéine de **Leafy K84C** se traduisant normalement par la formation de nouvelles liaisons C-S-C à des fréquences Raman caractéristiques.

Afin obtenir les meilleures conditions d'amplification par résonance des modes de vibrations des liaisons chimiques relatives au **RuCat** et à son environnement local, différents lasers d'excitation ont été testés (514 et 785 nm). Les spectres enregistrés avec une excitation à 514 nm, se situant dans la bande d'absorption de **RuCat**, qui auraient théoriquement dû montrer une forte résonance des modes en question, se sont malheureusement avérés saturés par la fluorescence du complexe de ruthénium et donc inexploitable. En revanche, les expériences effectuées avec un laser d'excitation à 785 nm, bien qu'éloigné du maximum d'absorption, ont montré une pré-résonance intéressante tout en évitant la fluorescence du complexe. Nous avons alors enregistré le spectre Raman du complexe **NH₂-RuCat-Cl** seul à l'état solide sous forme de poudre (Figure III.19, en rouge) puis celui d'un cristal de la protéine **Leafy K84C** seul, et enfin ceux des cristaux des hybrides **RuCat-¹⁶OH₂-Leafy K84C** (Figure III.19, en bleu clair) et **RuCat-¹⁸OH₂-Leafy K84C** (Figure III.19, en bleu foncé) obtenus respectivement en présence de H₂¹⁶O et de H₂¹⁸O.

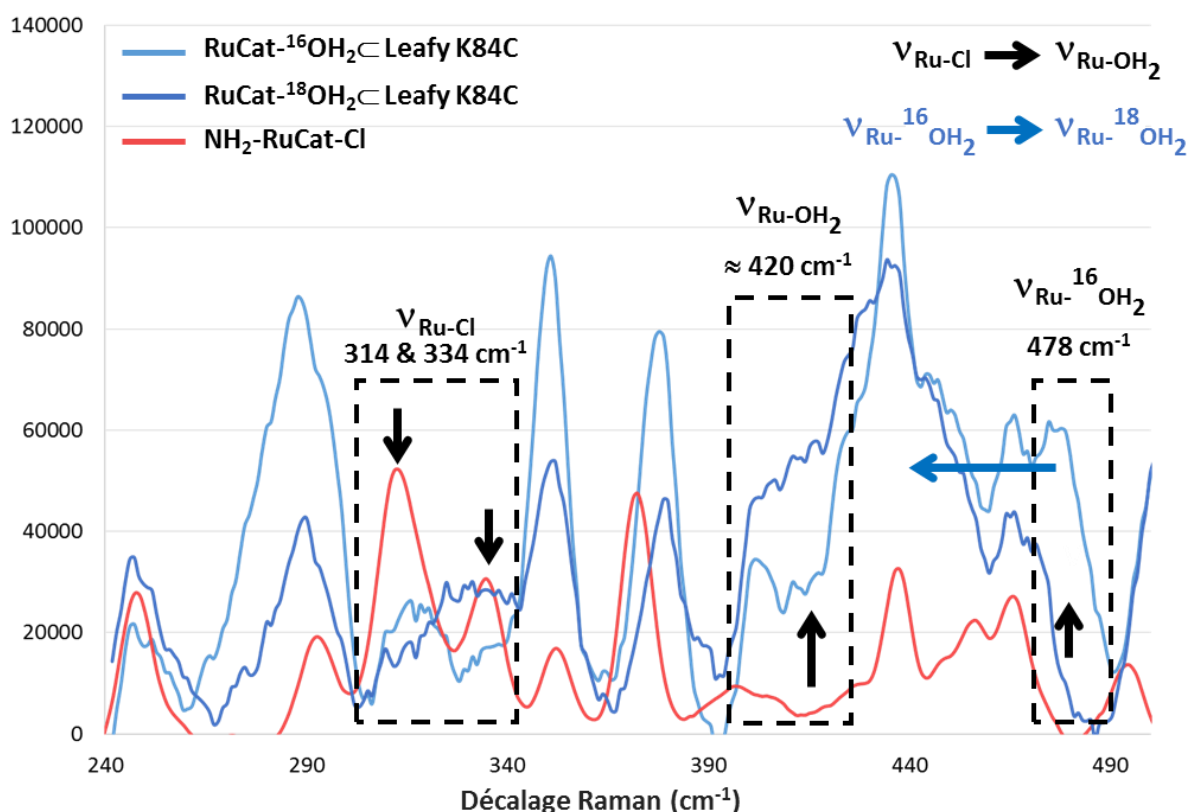


Figure III.19 : Spectres Raman de **RuCat-¹⁶O₂<Leafy K84C** (en bleu clair), **RuCat-¹⁸O₂<Leafy K84C** (en bleu foncé), **NH₂-RuCat-Cl**(en rouge) enregistrés entre 240 et 500 cm⁻¹. Les flèches noires correspondent aux changements du spectre observables lors de la substitution chloro/aquo. La flèche bleue indique les changements supposés lors de la substitution isotopique ¹⁶O/¹⁸O.

La comparaison des différents spectres aurait dû révéler de nouvelles liaisons chimiques strictement relatives au greffage, en observant les modes de vibration présent uniquement dans le spectre de l'hybride **RuCat-OH₂<Leafy K84C** et absent à la fois dans les spectres de **Leafy K84C** et de **NH₂-RuCat-Cl** seul. Malheureusement cette analyse comparative n'a pas pu être réalisée, car les spectres Raman des cristaux de **Leafy K84C** sont totalement non-résonant à 785 nm (pas de bande d'absorption dans le visible), et se sont avérés extrêmement bruités et sans aucun signal Raman d'intensité exploitable. Par contre, cette étude montre que le greffage du **RuCat** dans un cristal de **Leafy K84C** apporte une amplification générale de l'ensemble des modes de vibration du cristal, y compris des modes relatifs à la protéine seule, et pourrait donc être utilisé comme une méthode d'amplification du signal Raman des cristaux biologiques si elle s'avérait généralisable.

Pour discriminer les modes de vibration d'intérêts permettant de confirmer la substitution chloro/aquo, nous avons comparé les spectres Raman de l'hybrides **RuCat-OH₂Leafy K84C** (Figure III.19, spectres en bleu clair pour ¹⁶O et en bleu foncé pour ¹⁸O) avec le spectre du complexe **NH₂-RuCat-Cl** (Figure III.19, spectre en rouge) dans la zone spectrale 240-500 cm⁻¹. On observe dans le spectre de **NH₂-RuCat-Cl** deux bandes intenses à 314 et 334 cm⁻¹ attribuées aux vibrations de la liaison Ru-Cl confirmées par la littérature,¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ et qui sont systématiquement absentes dans les hybrides **RuCat-OH₂Leafy K84C**. On remarque également une bande de vibration vers 375 cm⁻¹ présente dans tous les spectres, correspondant donc à une vibration propre au complexe de ruthénium (non attribuée), dont la fréquence est nettement influencée par la substitution Cl/¹⁶OH₂/¹⁸OH₂. Nous avons ensuite utilisé l'effet de substitution isotopique ¹⁶O/¹⁸O pour identifier les modes de vibration de la liaison Ru-OH₂ dans **RuCat-OH₂Leafy K84C**. En effet, les fréquences de ces modes doivent subir un décalage isotopique évaluable en utilisant la relation de la fréquence d'élongation d'une molécule diatomique en fonction de ses paramètres physiques:

$$\nu_{AB} = 1/2\pi \sqrt{K \left(\frac{1}{m_A} + \frac{1}{m_B} \right)}$$

dans laquelle K est la constante de force associée à la liaison chimique entre l'atome A de masse m_A et l'atome B de masse m_B. En utilisant les masses des atomes ¹⁶O, ¹⁸O et Ru (16, 18 et 101 g/mol), on obtient le rapport de décalage isotopique suivant :

$$\frac{\nu_{Ru-16OH_2}}{\nu_{Ru-18OH_2}} \sim 0,95$$

Expérimentalement, on observe deux bandes de vibration à 420 et 478 cm⁻¹ dans le spectre de **RuCat-¹⁶OH₂Leafy K84C** totalement absentes du spectre du complexe **NH₂-RuCat-Cl** et qui sont donc attribuées à des modes de vibration relatifs à la liaison Ru-¹⁶OH₂.^{144,146}

De plus, la fréquence de cette vibration dans **RuCat-¹⁸OH₂Leafy K84C** subit sous l'effet de la substitution isotopique, un déplacement vers le massif de pics situé à 450 cm⁻¹, que nous ne pouvons pas observer en raison de la superposition avec une bande de vibration particulièrement intense et large à 435 nm et qui est corrélée à la disparition de la bande à 478 cm⁻¹. Ces résultats apportent des preuves expérimentales complémentaires à la spectroscopie UV-visible et confirment que le greffage de **RuCat** dans **Leafy K84C** s'accompagne d'une substitution du ligand chloro par une molécule d'eau.

Concernant l'étude de la sélectivité du greffage de **RuCat** dans les cristaux de **Leafy K84C**, afin de discriminer les modes de vibration d'intérêt qui montreraient que le greffage s'effectue *via* une liaison spécifique sur la cystéine (C-S-C), nous avons comparé les spectres des hybrides **RuCat-OH₂C-Leafy K84C** (Figure III.20, spectres en bleu) avec celui du complexe **NH₂-RuCat-Cl** (Figure III.20, spectre en rouge) dans la zone spectrale 630-850 cm⁻¹.

La présence de bandes de vibration intenses à 697 cm⁻¹, 758 cm⁻¹ et 785 cm⁻¹ dans les spectres Raman des hybrides et systématiquement absentes dans celui du complexe **RuCat** permettent de faire les observations suivantes:

i) Ces bandes sont de fortes intensités et devraient correspondre à des liaisons chimiques de la protéine se situant dans l'environnement local du complexe.

ii) Ces bandes de vibration se trouvent dans le domaine de fréquence attendu du mode d'allongement de la liaison C-S (650 cm⁻¹ et 800 cm⁻¹) décrit dans la littérature.^{147,148}

iii) Les valeurs distinctes des fréquence observées (697 cm⁻¹, 758 cm⁻¹ et 785 cm⁻¹) peuvent s'expliquer par les différents modes de vibration associées à un pontage C-S-C.¹⁴⁹

Ce résultat suggère donc fortement que **RuCat** se grefferait sur l'unique cystéine de **Leafy K84C** par l'intermédiaire d'une liaison intermoléculaire C-S-C. Pour vérifier cette proposition, la production d'un dérivé sélénio-cystéine de la protéine **Leafy K84C** permettrait d'observer le déplacement de fréquence Raman dû à la substitution soufre par le sélénium et corroborerait ainsi l'attribution des modes de vibration C-S-C.

Par ailleurs, malheureusement, nous n'avons pas été en mesure d'observer l'apparition de nouvelles bandes pouvant permettre de caractériser l'ancrage aspécifique du second complexe. Par conséquent, celui-ci n'est soit pas de nature covalente, soit le mode de vibration de la liaison impliquée ne ressort pas de façon significative.

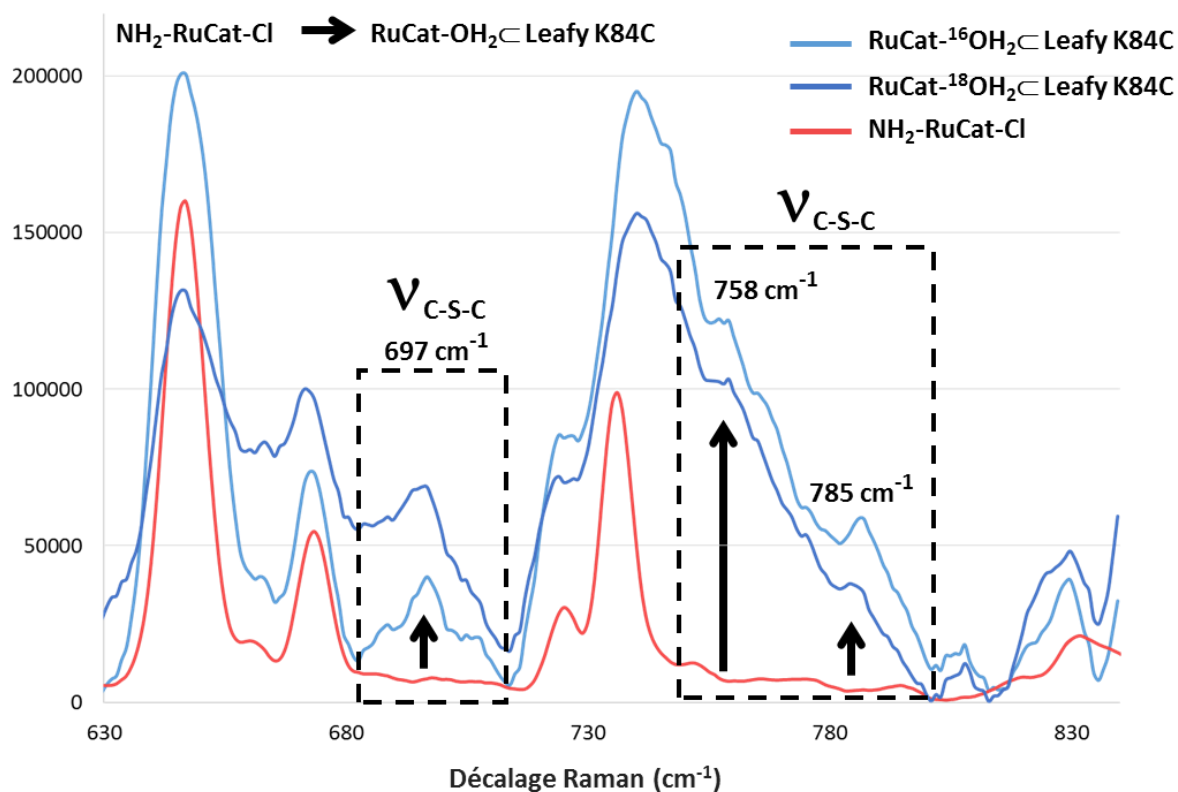


Figure III.20 : Spectres Raman de **RuCat-¹⁶O₂-Leafy K84C** (en bleu clair), **RuCat-¹⁸O₂-Leafy K84C** (en bleu foncé), **NH₂-RuCat-Cl** (en rouge) enregistrés entre 630 et 850 cm⁻¹. Les flèches noires correspondent aux changements du spectre observables lors du greffage de **RuCat** dans **Leafy K84C**.

3. Spectrométrie de masse

Les études en spectrométrie de masse (MS) ont été réalisées au laboratoire EdyP du CEA de Grenoble en collaboration avec Sylvie Kieffer-Jaquinod.

a) Masse native

Spectrométrie de masse Leafy K84C

Etant donné qu'une partie de la chaîne d'acides aminés en partie C-terminale (≈30 acides aminés) n'avait pas pu être observée en DRX à l'origine du projet, il était indispensable de vérifier que la séquence d'acides aminés des cristaux était bien identique à celle de la protéine en solution.

Pour cela une solution de **Leafy K84C** a été analysée en MS (Figure III.21, spectre bleu). Son spectre a ensuite été comparé à celui des cristaux dissous dans une solution aqueuse d'acide formique à 5% (Figure III.21, spectre noir). Sous ces deux formes **Leafy K84C** présente une

masse de 12787,6 en accord avec la masse théorique attendue. Il est également à noter que les deux spectres présentent des masses supérieures correspondant à des modifications de la protéine, (telles que des formylations) observées classiquement lors des analyses par spectrométrie de masse qui sont réalisées en présence d'acide formique. Le phénomène est plus intense dans le cas des cristaux puisque leur dissolution a nécessité la présence d'acide formique augmentant ainsi le taux de formylations. Néanmoins, cette analyse permet de conclure que l'intégralité de la séquence protéique est conservée *in crystallo*.

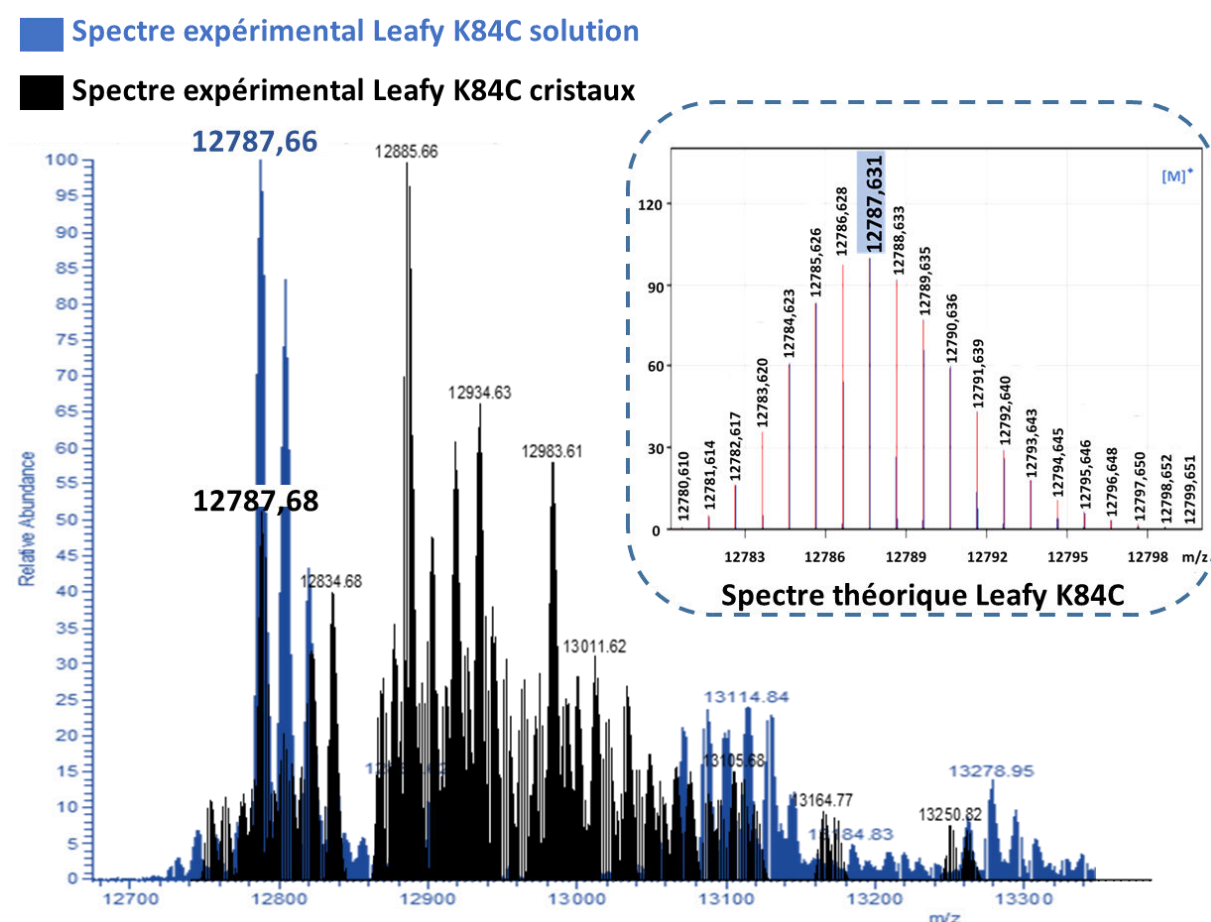


Figure III.21 : Spectres de masse déconvolués obtenus pour **LeafyK84C** en solution (spectre bleu) et pour **Leafy K84C** cristaux (spectre noir) et spectre théorique calculée pour **Leafy K84C** native.

Spectrométrie de masse des hybrides RuCat\subsetLeafy en solution

Dans un second temps, une autre étude a porté sur la sélectivité de greffage du complexe **IA-RuCat** sur les protéines **Leafy WT** (Figure III.22) et **Leafy K84C** (Figure III.23) en solution. Pour cela les deux protéines ont été greffées dans les mêmes conditions puis analysées en spectrométrie de masse.

On observe que le spectre de masse de la protéine sauvage greffée par le **IA-RuCat** est identique au spectre théorique attendu pour la protéine native (Figure III.22), confirmant ainsi que le complexe **IA-RuCat** ne se lie pas sur la protéine sauvage en solution; résultat attendu puisque cette protéine ne possède pas de cystéine comme point d'ancrage.

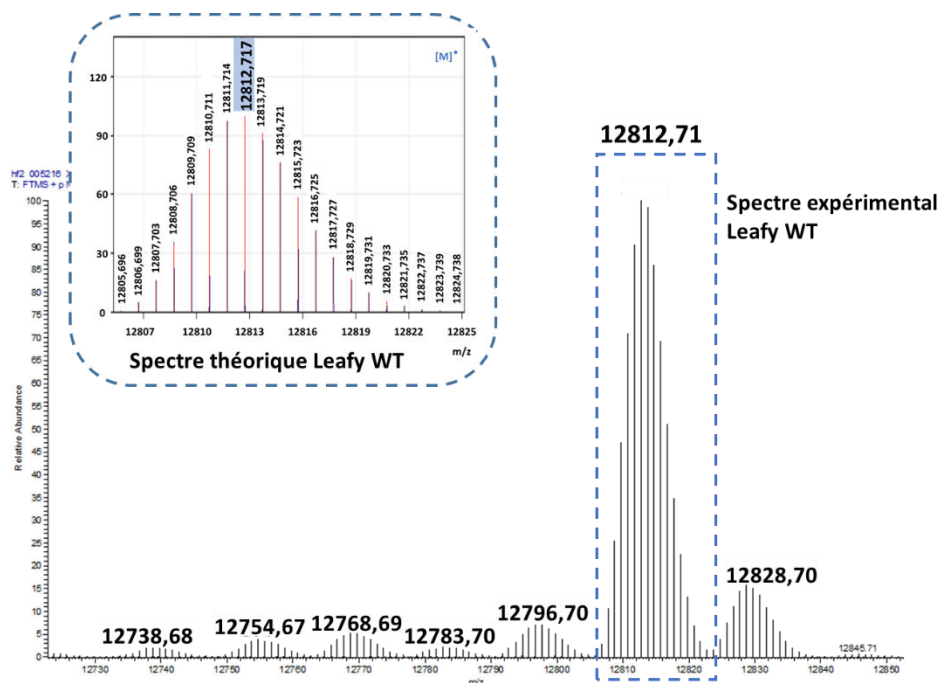


Figure III.22 : Spectre de masse déconvolué de **Leafy WT** en solution greffée par **IA-RuCat** et spectre théorique calculé pour **Leafy WT** native.

Concernant le mutant **Leafy K84C**, une différence de masse de 609,04 Da est observée entre la masse de la protéine non greffée (Figure III.23, spectre bleu) et celle qui a été greffée par le complexe **IA-RuCat** (Figure III.23, spectre noir). Cette masse correspond à un **unique** complexe **RuCat** dont le chloro a été échangé au cours de l'analyse LC/MS par une molécule d'acétonitrile utilisé comme solvant d'élution. On observe également la perte de l'iodure venant confirmer le greffage par la fonction iodoacétamide, ainsi qu'une perte de deux Da après déconvolution des espèces multichargées en une masse dite déconvoluée en tenant compte de la charge 2+ du ruthénium; l'outil de déconvolution considérant généralement que la charge est apportée par un proton. On peut également noter la présence de la masse 13374,69 Da de l'hybride dont le complexe porte un ligand aquo et de la masse 13355,69 Da de l'hybride dont le complexe de ruthénium a complètement perdu le ligand en position monodente.

Il est donc important de noter que le greffage du complexe **IA-RuCat-Cl** sur **Leafy K84C** en solution se fait de façon totalement spécifique puisque qu'un seul et unique complexe se greffe dans la protéine. Ceci vient confirmer le résultat obtenu en ICP-MS ou une stœchiométrie de 1:1 avait également été mesurée (Tableau III.3, p103).

■ Spectre expérimental Leafy K84C solution

■ Spectre expérimental RuCat-Leafy K84C solution

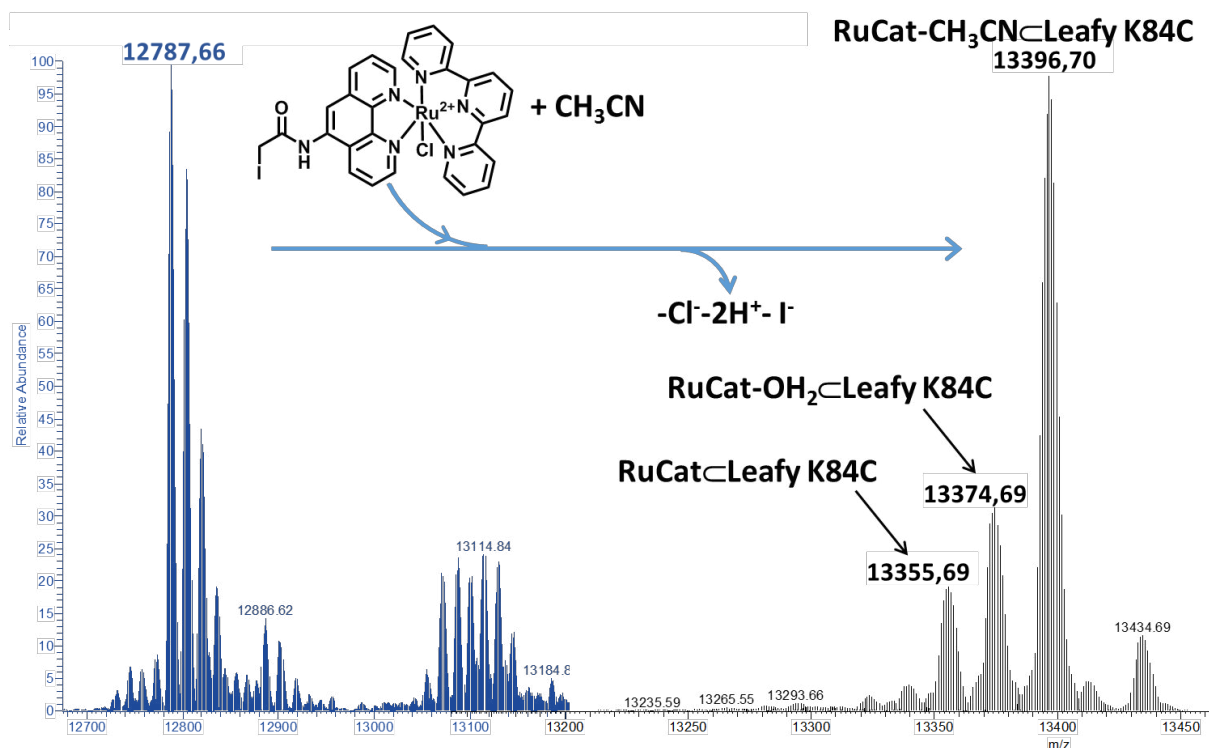


Figure III.23 : Spectres de masse déconvolués obtenus pour **LeafyK84C** en solution (spectre bleu) et pour **IA-RuCat-Leafy K84C** en solution (spectre noir).

Spectrométrie de masse des cristaux RuCat-Leafy K84C après solubilisation

La troisième étude a consisté en l'analyse des cristaux de leafy K84C greffés par **IA-RuCat-Cl** puis dissous afin d'être analysés en MS.

Pour cela, il était nécessaire de pouvoir redissoudre les cristaux hybrides. Nous avons été extrêmement surpris de voir que l'introduction des complexes de ruthénium apporte à l'hybride une stabilité très importante. En effet alors qu'une solution aqueuse à 1 % en acide formique permet la dissolution des cristaux seuls, celle des cristaux hybrides nécessite d'utiliser une grande concentration d'acide fort (20 μ L d' HNO_3 65%) ce qui n'est pas compatible avec les analyses en MS. Après de nombreux essais, la dissolution des cristaux a pu être réalisée dans une solution aqueuse à 5 % en acide formique en alternant plusieurs

cycles de congélation dans l'azote liquide/décongélation suivis d'une exposition d'au moins une heure dans un bain à ultrasons. Le spectre obtenu (Figure III.24, en vert) a été comparé à celui précédent obtenu lors du greffage de la protéine en solution (Figure III.24, en noir). Contrairement à nos attentes, alors que nous avons montré que deux complexes par protéine venaient se greffer au sein des cristaux de **Leafy K84C**, les deux spectres se sont révélés identiques. Ce résultat indique la perte d'un des deux complexes lors de la redissolution des cristaux. Par conséquent, ce résultat important suggère que le second complexe que l'on suppose provenir du greffage aspécifique viendrait se fixer *via* une ou plusieurs liaisons relativement faibles qui ne résisteraient pas aux conditions de redissolution des cristaux. Des liaisons par interactions π -stacking, ioniques ou encore des liaisons hydrogènes pourraient éventuellement être proposées et viendraient expliquer l'absence de signaux significatifs en spectroscopie Raman. Cependant, le spectre de masse des cristaux ne présente pas de massif isotopique à la masse 12787,7 Da correspondant à la protéine native (non montré sur le spectre) ce qui indiquerait un taux de greffage quantitatif *in crystallo*.

■ Spectre expérimental RuCat \subset Leafy K84C solution

■ Spectre expérimental RuCat \subset Leafy K84C cristaux

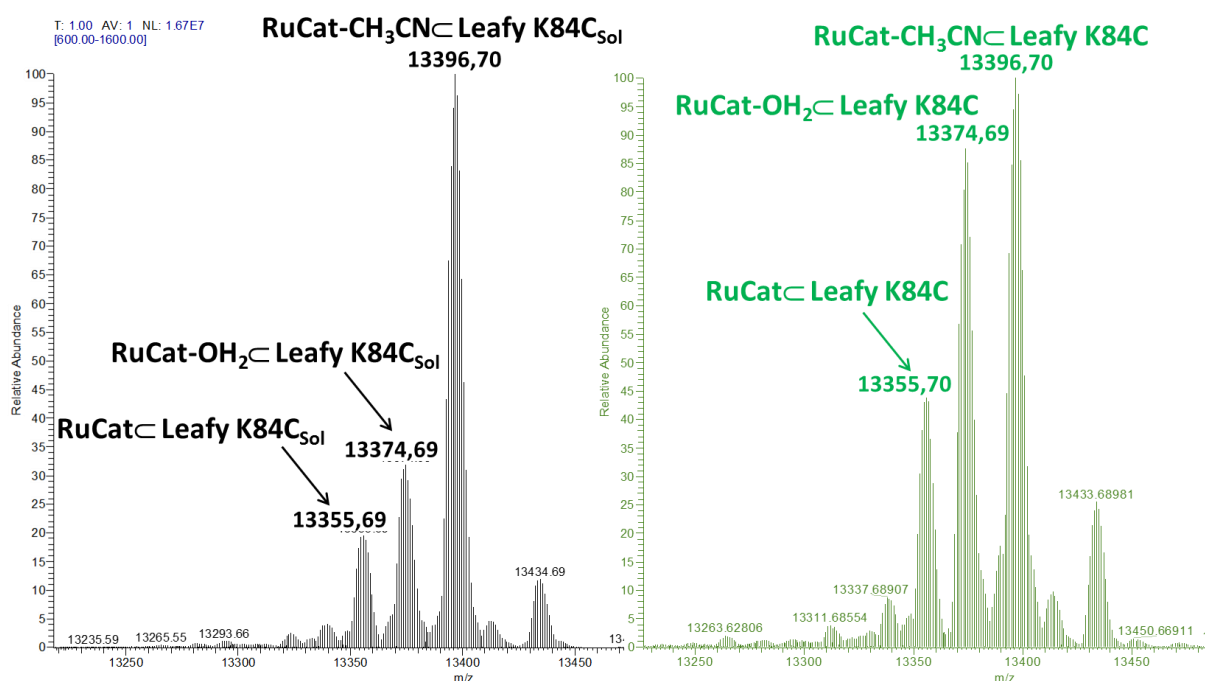


Figure III.24 : Spectres de masse déconvolués obtenus lors du greffage de IA-RuCat sur LeafyK84C en solution (spectre noir) et sur les cristaux de Leafy K84C (spectre vert).

Pour aller plus loin, il a été décidé de réaliser la digestion de **leafy K84C** greffée par **IA-RuCat** en solution (**RuCat-Leafy K84C-Sol**) et issu des cristaux (**RuCat-Leafy K84C**) ; ceci devant permettre de localiser l'ancrage du complexe après analyse MS/MS des peptides formés lors de la digestion.

b) Digestion par argC

Les deux échantillons **RuCat-Leafy K84C** redissous et **RuCat-Leafy K84C-sol** ont été déposés sur gel d'acrylamide afin de réaliser une digestion sur gel par la protéase ArgC.¹⁵⁰

L'ArgC dont les coupures s'effectuent en C terminal des arginines a été choisi en raison des peptides idéaux d'un point de vue analytique qui seraient produits lors de la digestion de **Leafy k84C** (Figure III.25).

Plus particulièrement, des coupures devraient avoir lieu juste avant la cystéine et après l'arginine 98 libérant de ce fait un peptide d'intérêt de 13 acides aminés portant la cystéine et qui devrait posséder un **RuCat** si le greffage s'est bien effectué sur cette dernière.

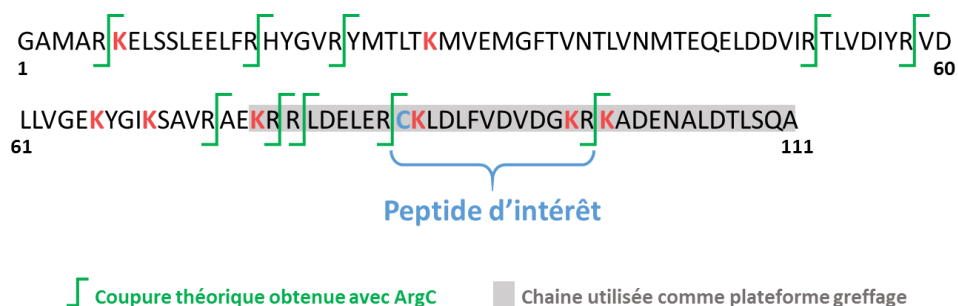


Figure III.25 : Coupures théoriques réalisées par ArgC sur **Leafy K84C**.

Les peptides de digestion et extraits du gel ont ensuite été injectés en LC-MS/MS où le peptide d'intérêt a pu être identifié après fragmentation par MS/MS. Que ce soit pour **RuCat-Leafy K84C-sol** ou pour **RuCat-Leafy K84C**, le peptide d'intérêt s'élué sous la forme de deux pics à 14,05 min et 14,53 min présentant tous deux le même spectre MS/MS c (Figure III.26).

Ces deux pics s'expliquent par la présence de deux stéréo-isomères du complexe au sein de la protéine. Mais plus important, ce résultat prouve sans ambiguïté le greffage du complexe sur un des acides aminés de ce peptide. Par ailleurs, il a été vérifié qu'aucun autre fragment peptidique ne contenait du ruthénium excluant l'ancrage covalent du second complexe.

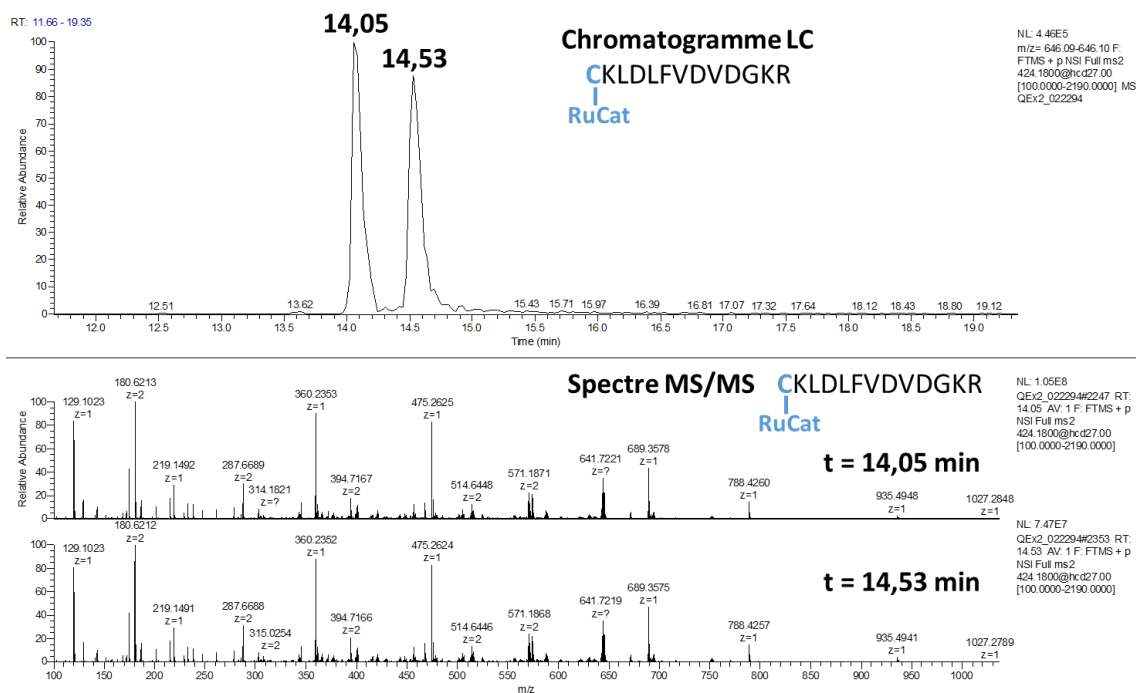


Figure III.26 : Chromatogramme sélectif de l'ion m/z 424,18 correspondant aux deux isomères du peptide d'intérêt ainsi que leurs fragmentations MS/MS respective.

Le peptide est ensuite fragmenté par MS/MS et les spectres obtenus ont été analysés par le logiciel Mascot après avoir ajouté la modification par le complexe comme modification variable ainsi que considéré l'acétonitrile comme possible perte de neutre. Cela a permis ainsi d'attribuer les fragments et de reconstituer la séquence du peptide (Figure III.27).

Les ions notés "y" représentent la fragmentation C-terminale du peptide et portent la charge sur l'amino (NH_3^+ , amino). A l'inverse les ions notés "b" représentent la fragmentation N-terminale du peptide et portent la charge sur l'acide carboxylique (CO^+ , acylium).

On peut observer sur la Figure III.27 que tous les ions "y" sont présents signifiant une couverture complète du peptide. Par ailleurs, leurs masses et leurs charges correspondent à des fragments ne comportant pas de ruthénium. Ce qui dans le cas de l'ion y12 composé de tous les acides aminés de la séquence à l'exception de la cystéine, correspond à une preuve de greffage sur cette dernière étant donné qu'un complexe a été observé sur le peptide de 13 acides aminés.

Concernant la série des ions "b", la cystéine est toujours présente dans leur séquence quel que soit leur taille. Si le greffage est sélectif de la cystéine alors chacun doit présenter une charge et une masse correspondant à la présence du RuCat. On observe sur la figure, la

présence d'ions fragments b doublement chargés liés à la présence de Ru^{2+} ainsi qu'une perte de masse de 41 Da correspondant à la perte du ligand acétonitrile (Figure III.27). Ces éléments déjà démontrés par ailleurs lors de l'étude du même échantillon en masse native (Figure III.24) est la preuve de la présence du complexe de ruthénium sur **Leafy K84C**.

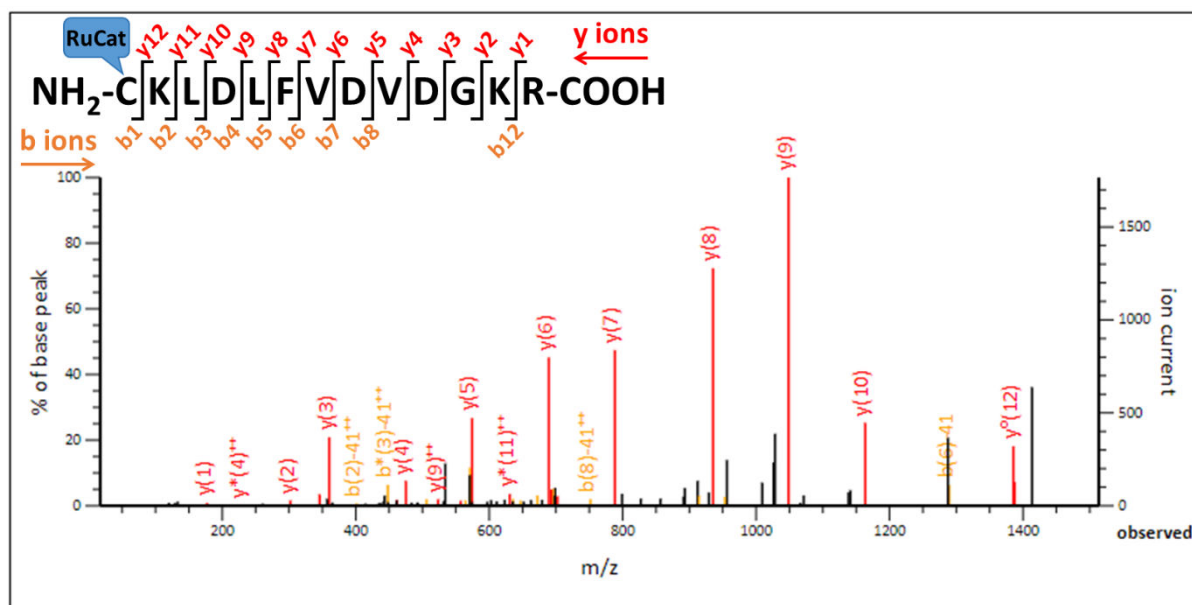


Figure III.27 : Spectre MS/MS de **IA-RuCat-Leafy K84C** cristaux après digestion à l'ArgC.

Ces résultats nous permettent ainsi de conclure que la fixation du complexe **RuCat** est parfaitement sélective du résidu cystéine de **Leafy K84C** que ce soit en solution ou *in cristallo*. Par ailleurs, dans ce dernier cas la présence du second complexe n'a pas pu être observée excluant de ce fait l'ancrage par une liaison forte de type covalente.

D. Conclusion

Les caractérisations réalisées sur l'hybride **RuCat-Leafy K84C** nous ont permis de mettre en lumière un comportement de greffage différent lorsque la protéine est en solution et lorsqu'elle est cristallisée.

En effet, alors qu'un seul complexe se greffe sur la cystéine de la protéine en solution, dans certaines conditions, un complexe supplémentaire peut venir s'ajouter lorsque le greffage est réalisé dans les cristaux. Très probablement, ce complexe additionnel viendrait se fixer non pas par une liaison covalente mais *via* des liaisons "faibles" comme de type π stacking,

électrostatiques ou hydrogène qui ne résisteraient pas aux conditions acides nécessaires à la ressolubilisation du cristal.

Nous avons également pu mettre en évidence, grâce à la spectroscopie UV-Visible réalisée sur les cristaux que lors du greffage du complexe **IA-RuCat-Cl** s'effectuait aussi une substitution du ligand chloro par une molécule d'eau. Rappelons que les espèces Ru-aquo sont des espèces qui ont montré des efficacités catalytiques lors de l'oxydation de sulfures⁵⁷ et de ce fait devrait nous éviter l'étape de conversion de l'entité Ru-Cl en Ru-OH₂ avant d'effectuer la catalyse.

III. Hybride chromophore : RuPhot-Leafy

Cette étude a été réalisée en grande partie par Olga Firstova (Stagiaire de M2) majoritairement sur la protéine **WT**.

A. Influence de la fonction d'ancrage

Afin d'introduire le chromophore (**RuPhot**) au sein de la protéine *via* une liaison covalente forte difficilement hydrolysable de type amide, trois résidus pouvaient être exploités : les acides glutamiques et aspartiques ainsi que la lysine qui présente une fonction amine. Dans les deux cas, la stratégie consiste à activer l'acide *via* un ester activé de type N-hydroxysuccinimide (**NHS**) avant couplage avec une fonction amine localisée soit sur le complexe (Figure III.28, voie 1) soit sur la lysine (Figure III.28, voie 2). Dans le premier cas cela implique la synthèse du complexe **NH₂-RuPhot** et dans le second cas la synthèse du complexe **NHS-RuPhot**.

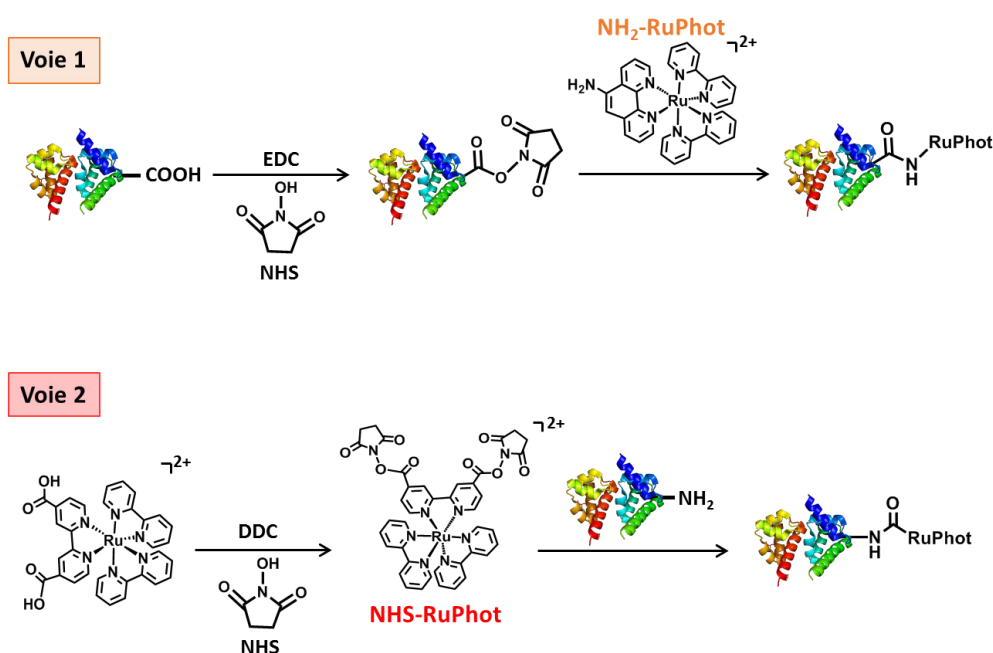


Figure III.28 : Stratégies envisageables pour le greffage du complexe **RuPhot**.

Initialement, le complexe **NH₂-RuPhot** avait été choisi en raison de son utilisation dans le groupe de Peters comme photosensibilisateur pour une hydrogénase ainsi que pour sa synthèse particulièrement aisée. Celui-ci venait se fixer sur les acides glutamiques et aspartiques en utilisant le 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide (**EDC**) comme agent de couplage.^{95,151}

1. Greffage sur les acides glutamiques et aspartiques

a) Synthèse du complexe $\text{NH}_2\text{-RuPhot}$

Cette synthèse en une étape (Figure III.29) ne présente pas de difficultés particulières et le complexe s'obtient avec un rendement de 96 % en suivant les protocoles expérimentaux donnés dans la littérature.^{95,152,153}

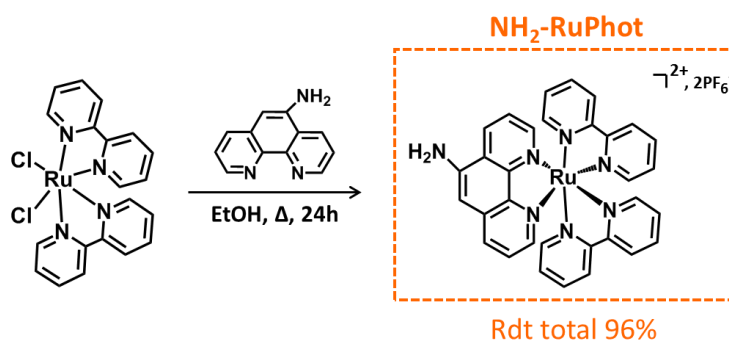


Figure III.29 : Synthèse du complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}\text{aminophen}(\text{bpy})_2](\text{PF}_6)_2$ ($\text{NH}_2\text{-RuPhot}$).

b) Conditions de greffages du $\text{NH}_2\text{-RuPhot}$

Malgré de nombreux tests (tampons, pH, solvants, concentrations, avec/sans NHS), il n'a malheureusement pas été possible de trouver des conditions de greffage satisfaisantes pour ce complexe. En effet, quelles que soient les conditions, la coloration observée restait très légère signe d'un taux de greffage faible (Figure III.30). Ceci a été confirmé par les dosages ICP/AES où la quantité de ruthénium est si faible qu'elle n'a pas pu être détectée. Il est surprenant d'obtenir un tel résultat alors que cette approche s'est montrée particulièrement efficace dans le cas de Peters mais pour un greffage réalisé sur une protéine en solution et non des cristaux.⁹⁵

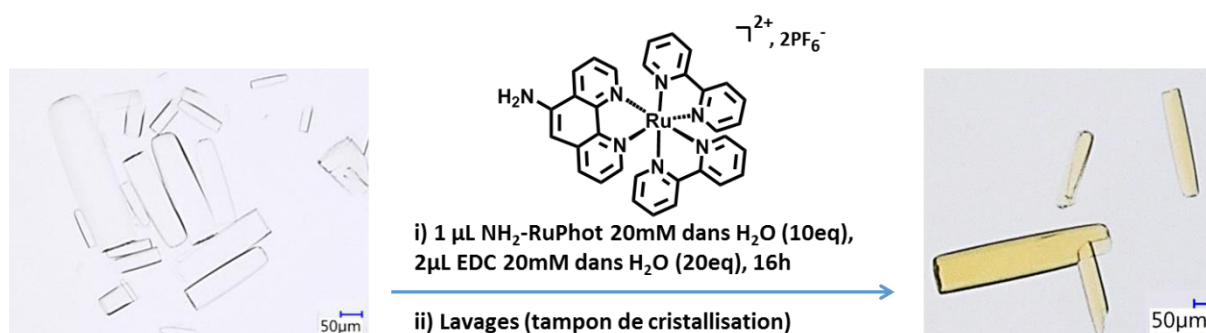


Figure III.30 : Conditions de greffage de $\text{NH}_2\text{-RuPhot}$.

Suite à ce problème, nous nous sommes orientés vers la seconde stratégie, en réalisant la synthèse du complexe NHS-RuPhot .

2. Greffage sur les lysines

a) Synthèse du complexe **NHS-RuPhot**

La première voie développée par Hirsch débute par la formation de l'ester activé NHS du ligand 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridine (**dc bpy**), suivie de la formation du complexe.¹⁵⁴ Néanmoins malgré plusieurs tentatives, l'étape de complexation a toujours entraîné l'hydrolyse des esters particulièrement sensibles.

Par conséquent, nous avons choisi la seconde approche qui consistait à synthétiser le complexe avant d'introduire les fonctions d'ancrage (Figure III.31). L'étape de complexation avec le ligand **dc bpy** est réalisée en premier lieu selon les conditions décrites par Beer permettant d'accéder au complexe intermédiaire avec un bon rendement de 70 %.¹⁵⁵ La dernière étape est la formation des esters activés. En suivant le protocole développé par Lakowicz, le complexe d'intérêt a pu être obtenu avec un rendement total de 35 %.¹⁵⁶ En raison de son instabilité particulièrement importante, le complexe est conservé sous forme de solide à -80 °C.

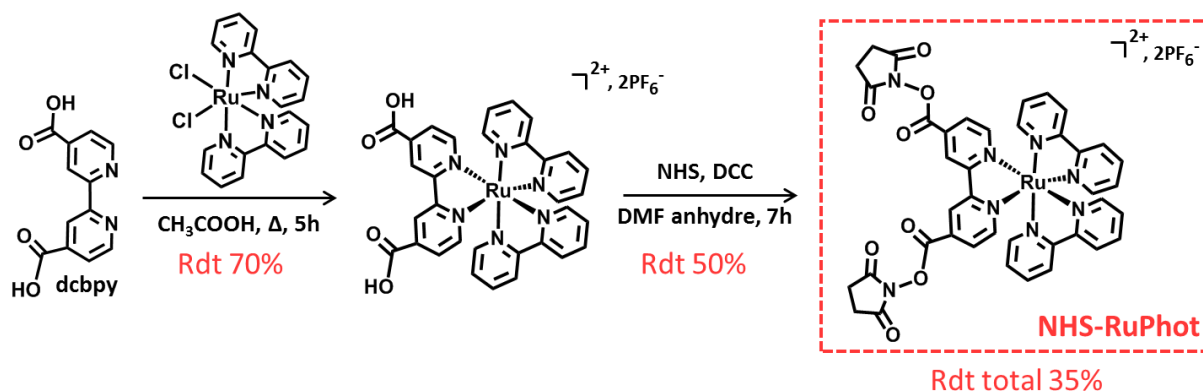


Figure III.31 : Synthèse du complexe **NHS-RuPhot** [Ru^{II}(bpy)₂(dcbpy-NHS)](PF₆)₂.

b) Greffage du NHS-RuPhot dans Leafy WT

En utilisant les mêmes conditions de greffage que pour **NH₂-RuPhot** c'est-à-dire 1 μL d'une solution à 20 mM de complexe ajouté aux 4 μL de la goutte de cristallisation de **Leafy WT**. Une coloration beaucoup plus intense qu'avec le complexe précédant a pu être observée (Figure III.32). C'est pourquoi il a été choisi d'utiliser cette approche pour le reste du projet.

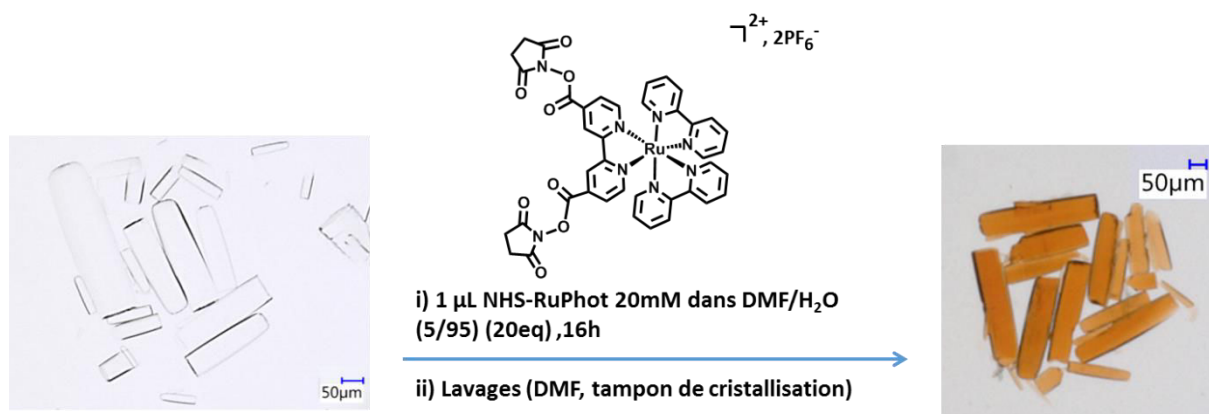


Figure III.32 : Conditions de greffage de **NHS-RuPhot** dans **Leafy WT**.

Comme le montre les spectres UV-Visible (Figure III.33) réalisés aussi bien sur les cristaux que sur le complexe en solution, l'intégrité du complexe semble avoir été conservée durant l'étape de greffage. Même si un élargissement de la MLCT aux environs de 470 nm a pu être observé. Cet élargissement pourrait s'expliquer par des complexes présentant des environnements différents influençant son électronique, comme ce fut avancé pour le complexe **RuCat**.

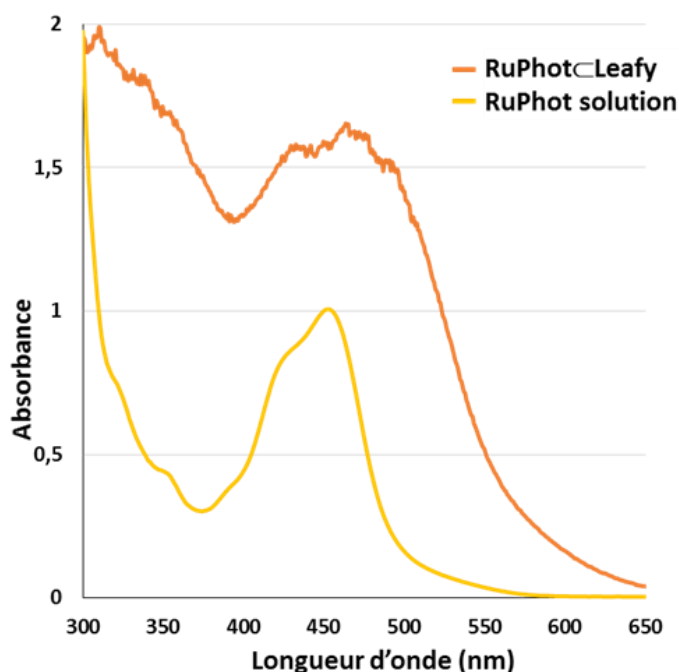


Figure III.33 : Spectre UV-Visible de **NHS-RuPhot-Leafy WT**.

Malheureusement, les autres techniques utilisées pour caractériser l'hybride **RuCat**Leafy **K84C**, n'ont pas pu être utilisées pour **RuPhot**Leafy pour les raisons décrites ci-dessous.

Spectrométrie Raman à résonance

La fluorescence émise par le complexe **RuPhot** après excitation au laser à 785 nm est trop importante et sature le spectromètre, empêchant toute détection du signal Raman.

Spectrométrie de masse - masse native

Etant donné qu'il est possible de greffer entre 3 et 7 complexes de **RuPhot** sur la protéine et que chacun de ces complexes apporte deux charges positives supplémentaires, cela implique d'analyser une protéine dont la charge serait comprise entre +21 et +25 pour un poids moléculaire de 13kDa. Ceci représente un excès de charge en rapport à la taille de la protéine, difficilement analysable en MS. De plus, cela conduit à un massif centré sur un m/z d'environ 700 ce qui est très faible; habituellement les massifs sont plutôt centrés sur un m/z d'environ 1000.

Par ailleurs, au-delà du problème de charge, le complexe **NHS-RuPhot**, présente deux fonctions d'ancrages, il est alors possible d'imaginer une liaison intermoléculaire entre le complexe et deux monomères différents de la protéine, ce qui rendrait sa solubilisation compliquée et entrainerait la formation de multimères protéiques dont le poids moléculaire serait beaucoup trop important pour l'analyse en masse.

B. Influence du solvant de greffage

Dans l'idée d'optimiser les conditions de greffage, il a été décidé de comparer le DMSO et le DMF comme solvant de dissolution pour le complexe de ruthénium. En effet ces deux solvants sont couramment utilisés pour introduire des molécules chimiques peu solubles dans les systèmes biologiques.

Les mêmes conditions de greffages ont été utilisées dans les deux cas c'est-à-dire 1 μL d'une solution de **NHS-RuPhot** à 10 mM dans un mélange 50/50 eau/DMSO ou eau/DMF au 4 μL d'une goutte de cristallisation, pendant une nuit (environ 10 eq complexe/lysine). Par ailleurs, afin d'éviter la réaction entre le complexe et le tampon Tris pH 7,2 qui présente une fonction amine pouvant réagir avec la fonction d'ancrage du complexe, celui-ci a été remplacé par un tampon HEPES pH 7,5. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous et montrent clairement que le mélange DMF/eau est un mélange de solvants de choix pour faire ce greffage. En effet, alors que dans un mélange DMSO/eau, la coloration des cristaux reste très faible après plusieurs lavages, celle-ci reste relativement intense lorsque le DMSO est remplacé par le DMF. A ce jour, nous n'avons pas d'explication pour cette différence.

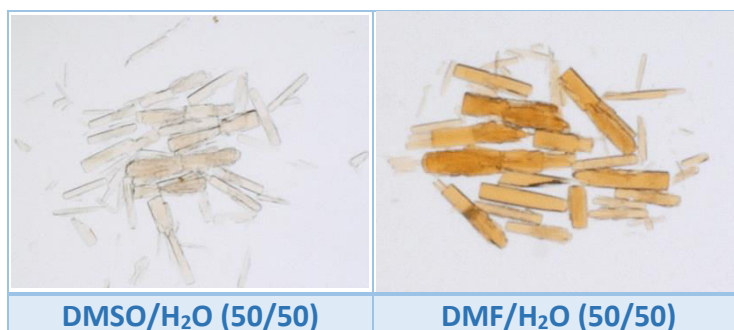


Tableau III.6 : Influence du solvant de solubilisation de **NHS-RuPhot** sur son taux de greffage.

C. Influence de la concentration en NHS-RuPhot sur le taux de greffage dans les cristaux de Leafy WT

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence de la concentration en **NHS-RuPhot** sur le taux de greffage. Après avoir déterminé par gel d'électrophorèse une concentration de $106,1 \cdot 10^{-12}$ mol de protéine cristallisée par goutte de cristallisation. Les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions de solvant et de temps d'incubation; seule la concentration en complexe a varié de 10 à 42 équivalents de complexe par lysine présente dans la protéine.

Etant donné que nous ne sommes pas en mesure de savoir combien de lysines sont réellement accessibles, nous nous sommes basé sur les neuf lysines présentes par monomère au lieu des cinq présentes sur la chaîne d'acides aminés utilisés pour le greffage. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.




Nombre d'équivalents de RuPhot/Lysine	10	16	42
			
Quantité de Ru (ng) (Dosage ICP/AES pour 5 gouttes)	non mesuré	260	390
Rapport Ru/protéine [Leafy WT] = $106,1 \cdot 10^{-12}$ mol/goutte	non mesuré	4,8	7,3
Rapport Ru/lysine Leafy WT = 9 lysines/monomère	non mesuré	0,5	0,8

Tableau III.7 : Influence de la concentration en **NHS-RuPhot** sur le taux de greffage dans les cristaux **WT**.

Il est clairement observé une évolution de l'intensité de coloration passant d'un jaune pâle à un orange intense, indiquant que plus la quantité de complexe présente en solution est élevée, plus le taux de greffage est important.

Afin de corréliser ces observations visuelles avec la quantité de ruthénium effectivement présente dans les cristaux, des mesures d'ICP/AES ont été réalisées. La même évolution est observée. Une stœchiométrie de 0,8 complexe par lysine a pu être mesurée. Sachant que toutes les lysines ne sont probablement pas accessibles donc fonctionnalisables, on peut s'interroger sur la quantité nécessaire pour atteindre un plateau correspondant au taux de greffage maximum du **NHS-RuPhot** *in crystallo*.

Afin de répondre à cette question, une cinétique de greffage du complexe **NHS-RuPhot** a été réalisée dans les cristaux de la protéine sauvage. Pour cela différentes quantités de complexe allant cette fois-ci de 5 à 110 équivalents de complexe/lysine ont été ajoutées aux cristaux et laissées incubées entre 2 h et 48 h. Les photos réalisées au microscope permettent d'avoir un aperçu visuel de la cinétique de greffage (Tableau III.8).

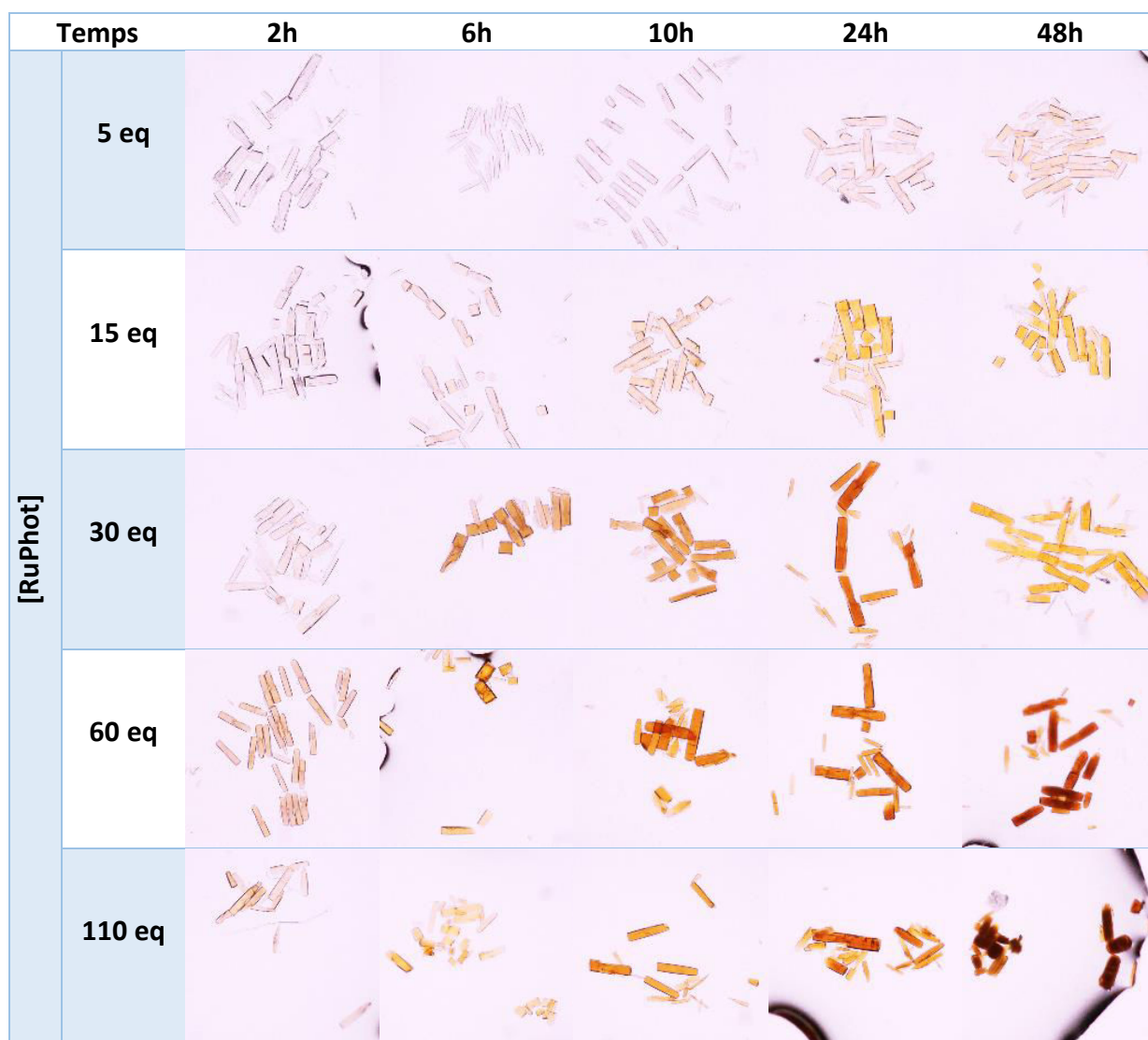


Tableau III.8 : Cinétique de greffage du complexe **NHS-RuPhot** dans les cristaux de **Leafy WT**.

De la même façon que pour le greffage du **RuCat** dans le mutant, on observe nettement que la coloration donc la quantité de **RuPhot** greffée croit avec le temps d'incubation et la quantité de complexe initialement ajoutée à la goutte de cristallisation sans pour autant semble-t-il atteindre un maximum. Les cristaux semblent vraiment agir comme de véritables éponges attirant et concentrant le complexe en leur sein.

Malheureusement, un problème expérimental lors de l'étape de minéralisation a rendu les résultats ICP inexploitable.

D. Influence de la concentration en **NHS-RuPhot** sur le taux de greffage dans les cristaux de **Leafy K84C**

Après avoir déterminé une concentration de $112,6 \cdot 10^{-12}$ mol de protéine cristallisée par goutte de cristallisation. Un test de greffage du **NHS-RuPhot** a également été réalisé sur les cristaux de **Leafy K84C** en ajoutant 19 et 44 équivalent de **NHS-RuPhot** / lysines (8 lysines/ monomère **Leafy K84C**). Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :



Nombre d'équivalents de RuPhot/Lysine	19	44
		
Quantité de Ru (ng) (Dosage ICP/AES pour 5 gouttes)	246	198
Rapport Ru/protéine [Leafy K84C] = $112,6 \cdot 10^{-12}$ mol/goutte	4,3	3,5
Rapport Ru/lysine Leafy K84C = 8 lysines/monomère	0,5	0,4

Tableau III.9 : Influence de la concentration en **NHS-RuPhot** sur le taux de greffage dans les cristaux de **Leafy K84C**.

De manière assez surprenante, nous n'observons pas comme dans le cas de la protéine sauvage, d'augmentation du taux de greffage avec la concentration en **NHS-RuPhot**. Celui-ci semble s'approcher de 4,3 complexes par protéine soit 0,5/lysine comme cela a été observé avec la protéine sauvage greffée avec 16 eq de complexe.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. La première serait due à une certaine instabilité des esters activés lorsqu'ils sont en solution aqueuse. Il avait en effet été observé que le complexe s'hydrolyse progressivement au cours du temps lorsqu'il n'est pas conservé à très basse température (-80 °C). La seconde hypothèse est liée au nombre de lysines accessibles au complexe. Si l'on considère que seules les quatre lysines présentes sur la chaîne située à l'intérieur "du tube" le sont alors dans ce cas la stœchiométrie de 1:1 serait atteinte. Cependant, ces résultats sont à relativiser car les expériences de greffage du **NHS-RuPhot** n'ont été réalisées qu'une seule fois et qu'en raison de l'instabilité des fonctions d'ancrage, il serait judicieux de les reproduire.

E. Conclusions

Bien que les systèmes **RuPhot**⊂**Leafy WT** et **RuPhot**⊂**Leafy K84C** soient beaucoup plus complexe à étudier en raison du nombre plus important de position greffables, nous avons néanmoins pu montrer que le complexe **RuPhot** est en mesure de se greffer dans les cristaux de **Leafy WT** et de **Leafy K84C**. Par ailleurs, les premier dosages ICP ont mesurés jusqu'à 4,3 complexes présents par monomère dans les cristaux de **Leafy K84C** confirmant ainsi la possibilité de greffer plus de **RuPhot** que de **RuCat** et rendant possible l'effet d'antenne espéré.

De plus, l'expertise que nous avons développée pour l'étude de l'hybride **RuCat**⊂**Leafy K84C** devrait nous permettre de pousser les caractérisations de **RuPhot**⊂**Leafy** notamment en spectrométrie de masse.

Tout comme cela avait été fait avec succès sur l'hybride **RuCat**⊂**Leafy K84C**, la même stratégie pourrait être appliquée à l'hybride **RuPhot**⊂**Leafy WT**. Après ressolubilisation, une digestion pourrait être envisagée afin d'obtenir des fragments plus petits comportant un à deux complexes de ruthénium, facilitant leur analyse et permettant de déterminer la sélectivité du greffage. Par exemple, il pourrait être envisagé d'utiliser la trypsine ou ArgC comme protéase afin d'obtenir des peptides assez courts et contenant une à deux lysines maximum afin de faciliter les analyses MS/MS et de limiter l'effet de charge dû aux complexes de ruthénium.

Les expériences de cinétiques de greffage doivent encore être affinées, puis l'efficacité de cet hybride pourra être évaluée au cours de tests catalytiques.

CHAPITRE IV

PHOTOCATALYSES

Chapitre IV : Photocatalyses

En se basant sur les conditions déterminées précédemment pour le greffage du catalyseur dans **Leafy K84C** et de l'entité chromophore dans la protéine sauvage, deux nouveaux hybrides combinant les deux partenaires au sein des cristaux ont été produits (**RuCat/0,5Ruphot** et **RuCat/3Ruphot**). Chacun de ces biomatériaux a été obtenu en commençant par greffer le catalyseur en présence de 14 équivalents/ cystéine de complexe devant permettre l'insertion d'un équivalent par monomère. Après 24h, l'excès de complexe est éliminé par lavage avant d'introduire la solution de **NHS-Ruphot** dans les conditions permettant d'en introduire soit 0,5 équivalents (14 équivalents/ lysine) conduisant à l'hybride mixte **RuCat/0,5Ruphot**, soit 3 équivalents (28 équivalents/ lysine) conduisant à **RuCat/3Ruphot**. Ces deux systèmes devraient nous permettre de vérifier l'influence de la concentration en chromophore *in crystallo* sur l'activité catalytique et ainsi souligner l'importance de l'effet d'antenne. Etant donné que, par manque de temps ni la quantification ni les caractérisations n'ont été faites sur ces deux nouveaux biomatériaux, nous n'avons pas jugé utile de rédiger un chapitre sur ces hybrides mixtes. Ceci implique bien évidemment que les résultats de catalyse qui vont suivre sont à prendre avec prudence d'autant plus que, par manque de temps, les catalyses n'ont pu être reproduites.

Ainsi l'efficacité catalytique des différents hybrides mixtes obtenus (**RuCat/0,5Ruphot** et **RuCat/3Ruphot**) a été testée lors de l'oxydation du 4-bromothioanisole comme substrat de référence et comparés aux systèmes de référence (**RuCat** et **Ruphot** en présence de 0,82 équivalent de chromophore en solution et un équivalent de catalyseurs respectivement).

Les cristaux issus de 5 gouttes de cristallisation ont donc été réunis dans une solution aqueuse (tampon Hepes-Na 20 mM pH 7,5) contenant le substrat (82 équivalents/**RuCat**), l'accepteur d'électron (164 équivalents/**RuCat**) et éventuellement le chromophore ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$; 0,82 équivalent/**RuCat**) ou le catalyseur (**NH₂-RuCat-Cl**; 1,22 équivalent/**Ruphot**) avant d'être irradié à 460 nm (LED bleues, 10 mW.cm⁻²); longueur d'onde correspondant à la MLCT du chromophore (Figure IV.1).

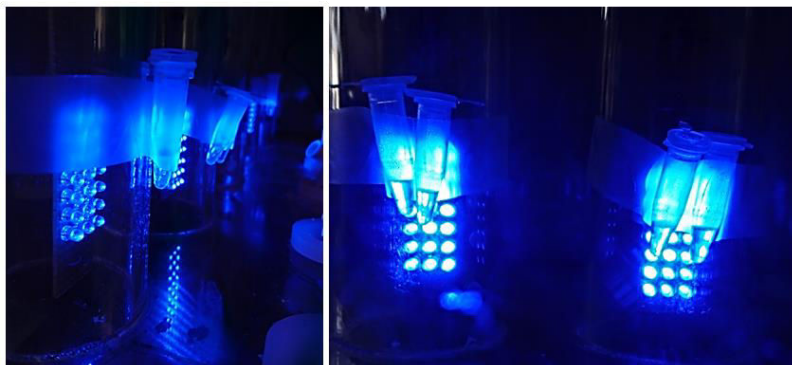


Figure IV.1 : Photographie du système à LED utilisé pour l'irradiation des cristaux.

Après 24h d'irradiation, le milieu réactionnel est extrait à l'acétate d'éthyle (2 x 40 μ L) et le mélange analysé par HPLC afin de déterminer la quantité de sulfure et de sulfoxyde présents. A la différence des catalyses réalisées en milieu homogène avec les dyades développées au laboratoire et pour lesquelles le sel de cobalt $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$ était utilisé comme accepteur d'électron sacrificiel, le méthylviologène (MV), lui a été préféré. En effet, même si le sel de cobalt a l'avantage d'être un accepteur d'électron irréversible à l'inverse du MV, il présente l'inconvénient majeur de conduire, après réduction, à l'espèce $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_2$ insoluble en milieu aqueux qui sédimenterait sur les cristaux.

Les résultats de catalyse sont donnés dans la Figure IV.2. Ils montrent que quelles que soient les conditions, une quantité non négligeable de sulfoxyde est formée (catalyse 1, entrées 1-4) allant jusqu'à 97 % de conversion avec le système **RuCat-Leafy K84C** ou le chromophore est en solution (catalyse 1, entrée 1). Inversement, lorsque les chromophores sont greffés (hybride **Ruphot-Leafy K84C**) la conversion est moins bonne mais reste tout de même relativement importante avec 68 % de conversion (catalyse 1, entrée 2). Cependant, les résultats les plus intéressants restent ceux obtenus avec les hybrides mixtes pour lesquels entre 75 % et 87 % de conversion a été observée soulignant l'efficacité de ces hybrides. Plus important encore, ils montrent que l'efficacité catalytique semble dépendre de la proportion catalyseur/chromophore. En effet, le doublement de la quantité de photosensibilisateur au sein des cristaux augmente de 12 points la conversion en sulfoxyde passant de 75 % à 87 %. Cette augmentation pourrait être mise sur l'effet d'antenne attendu en permettant d'une part d'augmenter la quantité de « collecteurs » de photons tout en rapprochant les entités catalytiques et photosensibles pour un transfert d'électron plus efficace. Malheureusement, quelles que soient les conditions, aucune énantiosélectivité n'a pu être observée.

Afin de vérifier la stabilité des matériaux, un second cycle catalytique avec les cristaux issus de la première catalyse, lavés (2 x 20 μL d'acétone puis 2 x 20 μL tampon Hepes 20 mM pH 7,5) avant d'être remis dans les conditions initiales. Les résultats obtenus (Figure IV.2, Catalyse 2) sont malheureusement loin d'être satisfaisants. En effet, toutes les catalyses pour lesquelles le photosensibilisateur n'a pas été rajouté (entrées 2, 3 et 4) montrent clairement une baisse conséquente de l'activité provenant probablement d'une instabilité des hybrides suite à une perte de l'entité chromophore lors de la catalyse.

Pour appréhender un peu mieux ces résultats, différents blancs ont été réalisés (Figure IV.3). Nous avons pu voir que, ni le méthylviologène seul (entrée 9), ni le catalyseur en solution (entrée 10), ni l'hybride **RuCat-Leafy K84C** (entrée 11), ni la protéine seule (entrée 12) ne sont en mesure de réaliser l'oxydation du sulfure en sulfoxyde de façon significative. Par contre, l'entrée 7 montre que, le chromophore en solution, en présence d'accepteur d'électron a le potentiel de réaliser la conversion quantitativement du sulfure. Pour expliquer un tel résultat, l'intervention d'oxygène singulet peut être avancée étant donné que toutes les catalyses ont été réalisées en présence d'air. En effet, il a été montré que cette espèce active de l'oxygène pourrait se former par transfert d'énergie du chromophore excité sur $^3\text{O}_2$ et avait le potentiel d'oxyder les sulfures.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Par contre, aspect surprenant, l'introduction du catalyseur diminue de façon significative la conversion pouvant suggérer l'intervention d'un second mécanisme impliquant le catalyseur. Pour s'affranchir de l'oxygène singulet, il sera donc nécessaire de réaliser les catalyses en condition d'anoxie imposant de ce fait des conditions opératoires beaucoup plus contraignantes qui, faute de temps n'ont pas pu être réalisées.

Toutefois, il semble évident que lors des catalyses effectuées avec les hybrides contenant l'entité chromophore, une certaine quantité de chromophore vient à se décrocher des cristaux. Trois hypothèses permettraient d'expliquer ce relargage. Tout d'abord il n'est pas à exclure que, contrairement à ce que nous espérons, le greffage ne se soit pas fait de façon covalente *via* la formation d'une fonction amide à partir de l'ester activé. Rappelons, que ce type de fonctions avait montré une instabilité significative nécessitant une conservation du complexe à $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

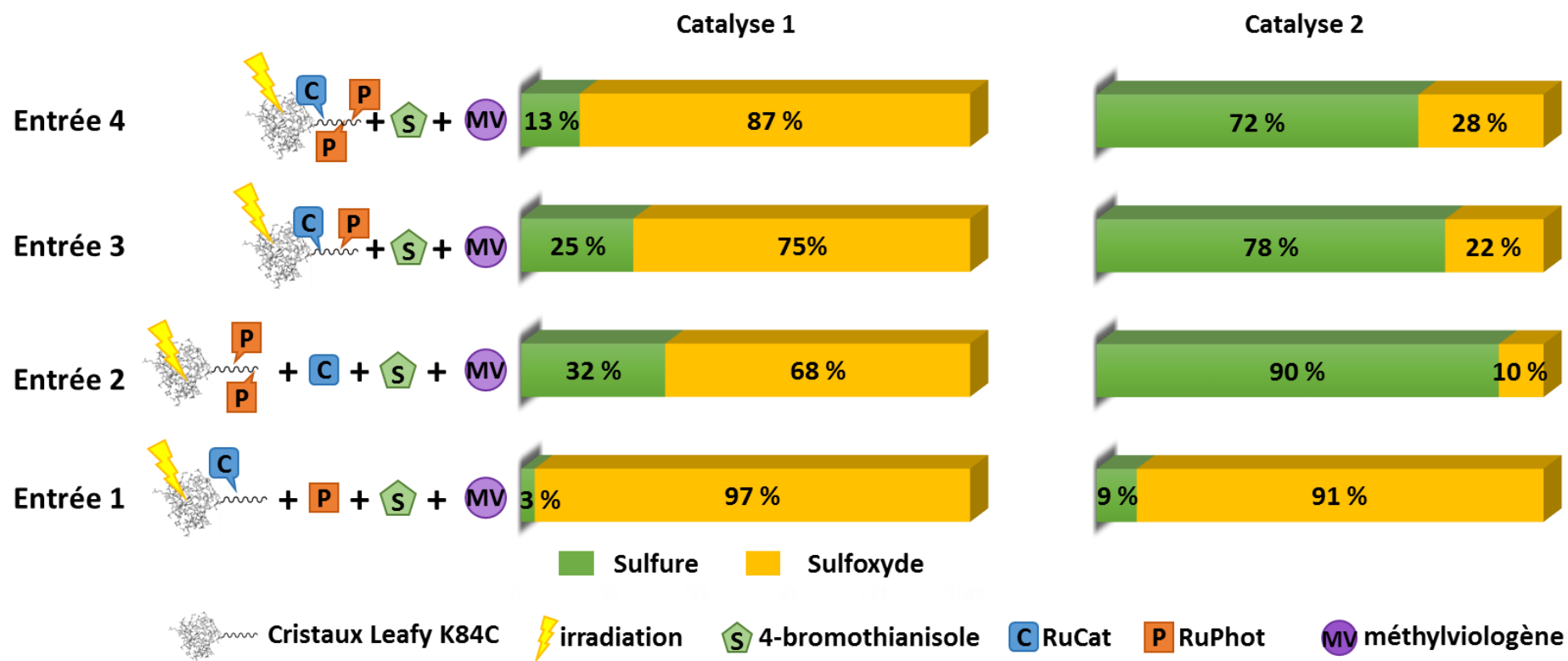


Figure IV.2 : Oxydation photocatalytique du 4-bromothioanisole utilisant un système à LED bleues comme source de lumière. Entrée 1: **RuCat**/**Leafy K84C** + 10 μL d'une solution de $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ à 50 μM ; Entrée 2 : **RuPhot**/**Leafy K84C** + 10 μL de **NH₂-RuCat** à 10 μM dans l'acétone; Entrée 3: **RuCat/0,5RuPhot**/**Leafy K84C**; Entrée 4: hybride **RuCat/3RuPhot**/**Leafy K84C**. Catalyse 1 : première catalyse réalisée avec un lot de cristaux. Catalyse 2 : Seconde catalyse réalisée après rinçage avec le même lot de cristaux que la catalyse 1.

Il est donc possible qu'une hydrolyse de cette fonction se produise dans les conditions de greffage empêchant ainsi l'ancrage sur les lysines. L'espèce obtenue chargée et présentant deux fonctions acide carboxylique viendrait alors se fixer dans le cristal *via* des interactions électrostatiques ou des liaisons hydrogènes résistantes aux lavages à l'acétone et à l'eau.

D'un autre côté, si l'on considère que l'ancrage covalent du chromophore est effectif, son relargage ne peut s'effectuer que selon deux voies :

- par hydrolyse de la liaison amide
- par photolabilisation des ligands du complexe

Cependant, dans ce dernier cas, le complexe résultant de la perte d'un ligand bipyridine serait photoinactif comme tous les complexes de type $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{XY}]^{2+}$ (X et Y pouvant être des molécules de solvant ou des anions présents dans le milieu réactionnel) et ne permettrait pas d'expliquer la réactivité observée. Il semble donc indéniable que les conditions de catalyse induisent le relargage d'une proportion importante du chromophore hors des cristaux, permettant l'oxydation du sulfure en sulfoxyde *via* la formation d'oxygène singulet. La catalyse ayant ainsi lieu à l'extérieur des cristaux, cette hypothèse permettrait également d'expliquer l'absence d'énantiosélectivité observée. Par ailleurs, l'hydrolyse de la fonction amide étant très peu probable, il semble indiscutable qu'une partie, ou la totalité des chromophores présents au sein des cristaux interagissent avec la protéine par des liaisons non covalentes ne résistant pas aux conditions de catalyse.

Néanmoins, l'activité de l'entité catalytique *via* probablement l'intervention d'un intermédiaire $\text{Ru}=\text{O}$ n'est pas à exclure totalement. Tout d'abord, lorsque les catalyses sont réalisées en absence de cristaux, l'addition de catalyseur dans le milieu réactionnel contenant le chromophore, le méthylviologène et le substrat conduit à une perte d'activité passant de 99 % à 76 % de conversion (entrées 5 et 7) soulignant un effet non négligeable du catalyseur sur l'efficacité globale. De la même façon, alors que l'hybride **RuPhot-Leafy K84C** (Figure IV.3, entrée 8) réalise 37 % de conversion l'introduction d'entités catalytiques dans les cristaux conduit à des efficacités bien supérieures de 75 et 87 % avec **RuCat/0,5RuPhot-Leafy K84C** et **RuCat/3RuPhot-Leafy K84C** respectivement (Figure IV.2; entrées 3 et 4).

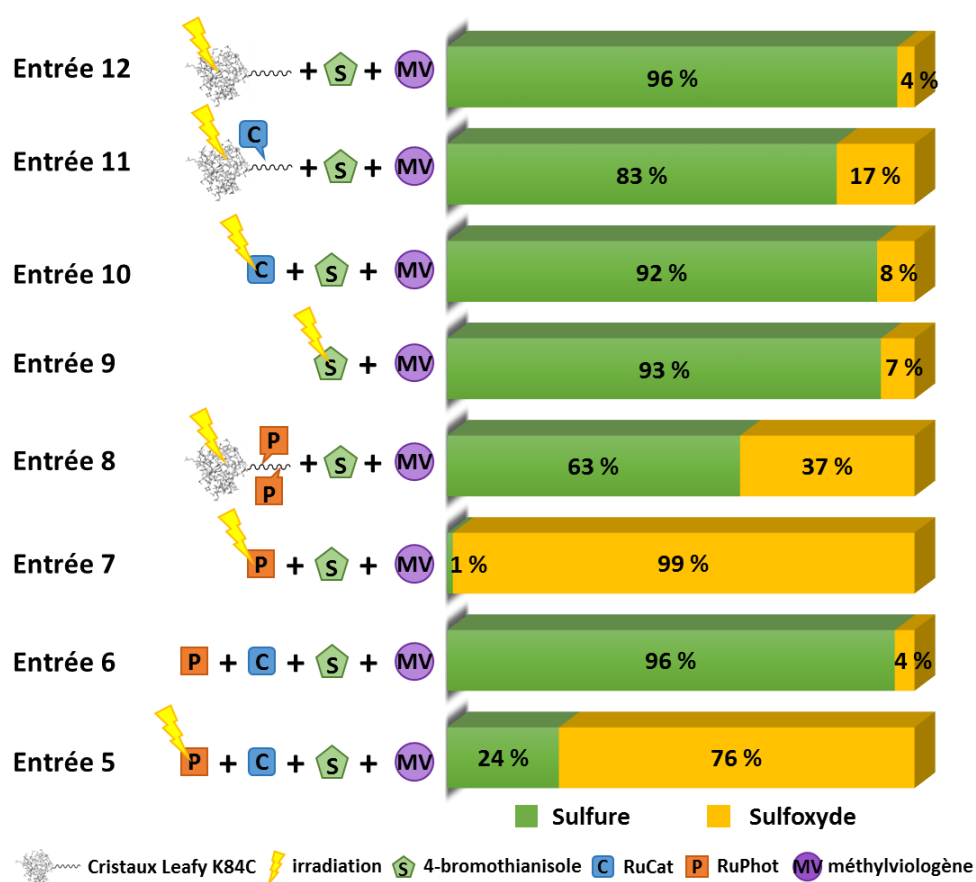


Figure IV.3 : Blancs de photocatalyses. Entrée 5 : **RuCat** et **RuPhot** en solution ; Entrée 6: **RuCat** et **RuPhot** en solution sans irradiation; Entrée 7: **RuPhot** en solution; Entrée 8 : hybride **RuPhot-Leafy K84C**; Entrée 9 : sans complexes de ruthénium; Entrée 10: **RuCat** en solution; Entrée 11 : hybride **RuPhot-Leafy K84C**; Entrée 12 : cristaux **Leafy K84C**.

Par conséquent, suite à ces résultats qui, rappelons-le, sont à prendre avec précautions, il semblerait que deux mécanismes compétitifs interviennent lors de l'oxydation du sulfure en sulfoxyde. Le premier mécanisme, prépondérant, ferait intervenir l'oxygène singulet formé à partir de $^3\text{O}_2$ par transfert d'énergie du chromophore **RuPhot** excité. Le second mécanisme impliquerait, cette fois ci, de l'entité catalytique. Il serait alors fort probable qu'un mécanisme faisant intervenir l'espèce $\text{Ru}=\text{O}$ oxydante obtenue par transfert d'électron photoinduit à partir de l'entité $\text{Ru}-\text{OH}_2$ puisse être avancé. La réalisation de nouveaux tests catalytiques, en boîte à gants, nous permettrait d'évaluer l'importance de ces mécanismes.

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

Conclusion générale & perspectives

Bien que l'origine des nanotechnologies remonte probablement à la fin des années 1960 avec le séminaire prophétique donné par R. Feynman lors d'un congrès de la Société Physique Américaine et intitulé "There's plenty of room at the bottom", la recherche dans ce domaine a réellement connu un essor dans les vingt dernières années. En effet, notamment grâce au développement des nanotechnologies (design, conception, caractérisation et utilisation), il a été montré que le monde nanométrique permettait d'accéder à des propriétés pouvant être bien différentes des matériaux micro et macroscopiques ouvrant ainsi la voie à de nombreux domaines.

Plus particulièrement, certaines biomacromolécules comme l'ADN ou certaines protéines ont la particularité de s'autoassembler formant des nanostructures sophistiquées hautement ordonnées (cages, fibres, tubes, multicouches et cristaux) pouvant justifier leur utilisation pour la conception de nouveaux biomatériaux.¹⁶⁰⁻¹⁶³ Concernant les matériaux protéiques, ceux-ci possèdent des propriétés particulièrement intéressantes comme par exemple :

- i) Une certaine stabilité et solubilité dans des conditions biologiques.
- ii) Une organisation hautement structurée, un environnement confiné et chiral.
- iii) Des acides aminés comme les cystéines, les lysines et les différents acides représentant autant de sites d'ancrage pour différentes molécules.
- iv) La possibilité de moduler la séquence par mutation.

C'est donc dans ce contexte qu'est né ce projet de thèse. Il consistait à réunir deux objets, un biologique et un autre inorganique issus de deux équipes possédant des expertises différentes vers un seul objectif, concevoir des biomatériaux hybrides pour la photocatalyse asymétrique. Plus particulièrement, il s'agissait d'introduire et ceci de façon sélective un catalyseur d'oxydation et des chromophores au sein d'une structure protéique en nid d'abeille formée par auto-assemblage ; cette dernière devant apporter une stabilité accrue au système catalytique ainsi qu'un environnement asymétrique devant permettre de réaliser des réactions énantiosélectives. Cependant, bien que chacune des deux équipes maîtrisent parfaitement d'un côté la production et la cristallisation de la protéine utilisée et, de l'autre côté la synthèse organique et inorganique permettant d'accéder aux photocatalyseurs, à l'origine de ce projet, deux paramètres essentiels restaient inconnus. Le premier était

« comment introduire de façon sélective et contrôlée le catalyseur et les chromophores au sein de la structure protéique ? ». Ensuite, l'autre question était « quelles sont les différentes techniques accessibles qui nous permettraient de caractériser les matériaux hybrides obtenus à l'échelle moléculaire et plus particulièrement de quantifier les complexes introduits au sein de la structure protéique cristalline ? »

L'idée initiale de développer, pour commencer, les demi-systèmes **RuCat**⊂**Leafy K84C** et **Ruphot**⊂**Leafy WT** avait deux objectifs. Cela nous permettait en effet de nous familiariser avec ce type d'objet aussi bien pour leur conception que pour leur caractérisation mais également d'avoir des systèmes de référence pour la catalyse. Ainsi, au cours de cette thèse nous avons conçu trois nouveaux biomatériaux l'un (**RuCat**⊂**Leafy K84C** contenant uniquement le catalyseur d'oxydation inséré dans le mutant **Leafy K84C** présentant une seule et unique cystéine comme site de greffage; un second (**Ruphot**⊂**Leafy WT**) dans lequel le chromophore a été greffé et enfin un troisième contenant à la fois le catalyseur et une certaine quantité de chromophores (**RuCat/Ruphot**⊂**Leafy K84C**). Le premier système a été parfaitement bien caractérisé même si, à notre grand regret la diffraction des RX sur laquelle nous comptions beaucoup s'est avérée inutile probablement en raison de la flexibilité/désordre trop importante des sites de greffages des complexes au sein de la protéine ou de l'hétérogénéité du greffage au sein de la structure. Néanmoins, l'ICP nous a permis d'obtenir des informations essentielles sur la quantité de complexes pouvant être greffés ainsi qu'une idée de la cinétique de greffage. Ces informations couplées à celles obtenues par la spectrométrie de masse et la LC-MS/MS réalisée après digestion enzymatique du matériau **RuCat**⊂**Leafy K84C** nous ont permis de mettre en évidence la sélectivité du greffage. En effet, il s'est avéré que, dans certaines conditions (14,2 eq **RuCat**/cystéine, 48 h), nous étions en mesure d'introduire deux catalyseurs par monomère ; l'un venant se greffer sélectivement comme envisagé par liaison covalente sur la seule et unique cystéine de la protéine présente sur la chaîne située à l'intérieur du tube ; le second complexe, quant à lui venant probablement se greffer par des liaisons non covalentes pouvant être de type électrostatiques, hydrogène ou π -stacking. Il a également été observé que l'insertion de ces complexes au sein de cristaux apportait une résistance conséquente au cristal, propriété particulièrement intéressante pour ce type de matériaux destinés à la catalyse hétérogène.

En effet, alors que les cristaux de Leafy se solubilisent facilement dans une solution aqueuse à 1 % en acide formique, la dissolution des hybrides nécessite des conditions bien plus drastiques (20 μL d' HNO_3 65 % ou 20 μL d'une solution aqueuse à 5 % en acide formique en alternant plusieurs cycles de congélation dans l'azote liquide/décongélation suivis d'une exposition d'au moins une heure dans un bain à ultrasons).

Par ailleurs, les spectroscopies UV-visible et Raman nous ont apporté des informations essentielles sur la structure moléculaire du complexe greffé. Nous avons en effet pu mettre en évidence une substitution du ligand chloro par une molécule d'eau au cours du greffage. Nous avons même pu observer la vibration de liaisons C-S-C venant confirmer le greffage sélectif d'un des deux complexes sur la cystéine.

Par la suite, il serait intéressant de réaliser une étude plus poussée en spectroscopie Raman *in crystallo* notamment en présence d'un oxydant permettant de convertir le système Ru-H₂O en Ru=O afin d'obtenir une signature spectrale de cet intermédiaire de catalyse. Un test préliminaire avait été réalisé en présence de sel de Ce^{IV} mais sans résultat concluant en raison d'une déformation importante des cristaux probablement due au fort pouvoir oxydant de cette espèce. Il serait par conséquent intéressant de tester d'autres oxydants moins préjudiciables pour les cristaux.¹⁶⁴

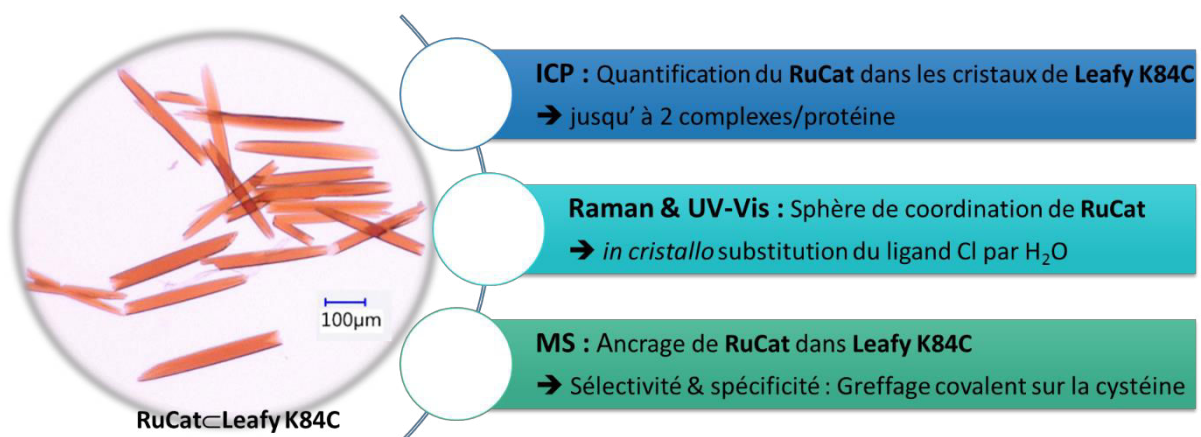


Figure 5 : Bilan des caractérisations réalisées sur l'hybride **RuCat-Leafy K84C**.

L'expertise développée avec l'hybride **RuCat-Leafy K84C**, aurait dû nous permettre d'envisager l'étude plus approfondie du système **RuPhot-Leafy**. Or, les résultats préliminaires de catalyse, même s'ils nécessitent d'être reproduits et sont de ce fait à prendre avec

précaution, ont montré un relargage significatif du chromophore lors de la catalyse. Il est fort probable, que, contrairement à ce que nous souhaitions, l'insertion de ces entités au sein des cristaux ne se fassent pas *via* la formation de liaisons covalentes de type amides mais plutôt grâce à des liaisons plus faibles de type électrostatique ou hydrogène. Une hydrolyse prématurée de l'ester activé avant même le greffage pourrait en être la cause. Ainsi, les esters activés par la fonction NHS seraient hydrolysés exposant de ce fait les carboxylates aux acides aminés présents à proximité. Il serait alors possible sous l'effet de l'irradiation et/ou de la chaleur, que ces liaisons plus faibles soient rompues libérant les chromophores hors du cristal. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'appliquer à l'hybride **RuPhot \subset Leafy WT** la même stratégie de digestion par ArgC qui a été utilisée avec succès sur l'hybride **RuCat \subset Leafy K84C**. Cette stratégie permettrait d'obtenir des peptides assez courts contenant une à deux lysines maximum afin de faciliter les analyses MS/MS. L'absence de fragments fonctionnalisés, par un complexe ou par un ligand phénanthroline nous permettrait de conclure. Néanmoins, bien que tout ceci reste à confirmer, il semble indéniable que nous devons dans le futur nous tourner vers d'autres fonctions de greffage (isocyanate, isothiocyanate ou chlorure de sulfonyle).

Cependant, même s'il a été montré qu'un mécanisme d'oxydation impliquant uniquement le chromophore libéré était prédominant *via* la formation de l'espèce oxydante $^1\text{O}_2$, il semblerait qu'un second mécanisme d'oxydation intervienne également, nécessitant la présence conjointe du chromophore et du catalyseur au sein des cristaux. Si cette observation s'avérait confirmée alors un mécanisme impliquant un transfert d'électron photoinduit de l'entité catalytique Ru-OH₂ vers l'accepteur d'électron *via* le chromophore conduisant à l'espèce oxydante Ru=O pourrait être avancé.

Dans un futur proche, les perspectives de ce projet se trouvent principalement dans les études de greffage et de caractérisations des hybrides **Ruphot \subset Leafy WT**, **Ruphot \subset Leafy K84C** et des hybrides mixtes **RuCat/Ruphot \subset Leafy** ainsi que dans l'étude de leurs propriétés photocatalytiques.

Il serait également intéressant d'effectuer les tests catalytiques avec les hybrides déjà obtenus en l'absence d'oxygène afin de mettre en évidence l'intervention ou non d'un mécanisme impliquant l'entité catalytique

Perspectives à plus long terme

Le principal intérêt de la protéine Leafy est de pouvoir utiliser sa partie C-terminale comme une plateforme relativement facilement modulable. Ces modifications peuvent aussi bien porter sur la protéine elle-même en particulier sur la chaîne interne que sur les catalyseurs à internaliser. Toutes ces modifications potentielles ouvrent donc la voie à de nombreuses perspectives.

Concernant la protéine, par exemple, il pourrait être intéressant d'arriver à contrôler le diamètre des tubes protéiques dans le cristal afin de pouvoir jouer aussi bien sur le nombre que sur la taille des catalyseurs et des substrats. Ceci devrait pouvoir être réalisé par des mutations sélectives même si, comme nous avons pu le voir au cours de cette thèse, l'introduction d'une seule mutation peut influencer drastiquement la cristallogénèse. De la même façon nous pourrions, grâce à des mutations sélectives intervenir sur la localisation et le nombre de sites greffables, afin d'étudier l'impact de ces modifications sur l'activité catalytique et notamment sur la sélectivité (chimio et stéréosélectivité). Cette stratégie devrait également permettre d'optimiser les distances entre les différents partenaires **RuCat** et **RuPhot**, et ainsi faciliter les transferts d'électrons nécessaires à la réalisation du cycle catalytique.

Les modifications peuvent également intervenir sur les complexes. Ainsi, dans les projets à venir, il est envisagé d'introduire au sein de la structure cristalline en plus du chromophore, deux catalyseurs différents pour développer de la photocatalyse tandem asymétrique. Un premier catalyseur à base de cobalt^{165,166}, ou de fer¹⁶⁷ permettrait de réaliser la réduction de protons en hydrogène qui serait immédiatement adsorbé par des nanoparticules de platine ou de palladium réalisant l'hydrogénation catalytique asymétrique d'alcènes (Figure 6). Dans ce contexte, différentes équipes ont déjà montré la faisabilité de l'insertion de telles nanoparticules dans des cristaux protéiques¹¹¹, dans des silices mésoporeuses^{117,168,169} et même dans des virus¹⁷⁰ pour la production d'hydrogène ou la réduction de substrats organiques.

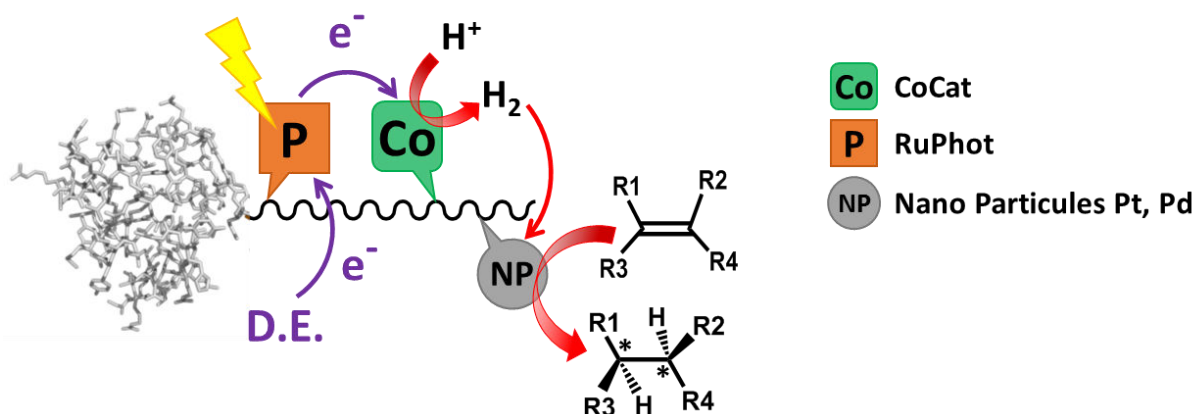


Figure 6: Stratégie de développement des photocatalyseurs biohybrides pour l'hydrogénation catalytique asymétrique d'alcènes.

Une amélioration technologique pourrait également être apportée par le développement de puces microfluidiques permettant la croissance des cristaux directement dans la puce. Ce type de stratégie permet de s'affranchir de la manipulation des cristaux qui est extrêmement coûteuse en temps et très fastidieuse. Il présente également l'avantage de pouvoir réaliser toutes les étapes de fonctionnalisation plus simplement. La Figure 6

Figure 7 ci-dessous présente un exemple de puce microfluidique développée par l'équipe de José A. Gavira.¹⁷¹ Les entrées permettant d'ajouter dans un premier temps la solution de protéine et le tampon de cristallisation qui sont ensuite mélangés dans le serpentin avant d'être introduits dans le réseau de micropuits pour la cristallisation. Une fois les cristaux obtenus, il est facile d'imaginer la réalisation des lavages et des greffages par injection des différentes solutions dans les entrées et récupération des solutions usagées en sortie de la puce. Selon le même principe les catalyses pourraient également être directement réalisées dans la puce en injectant les substrats aux entrées et en extrayant les produits de réaction à la sortie.

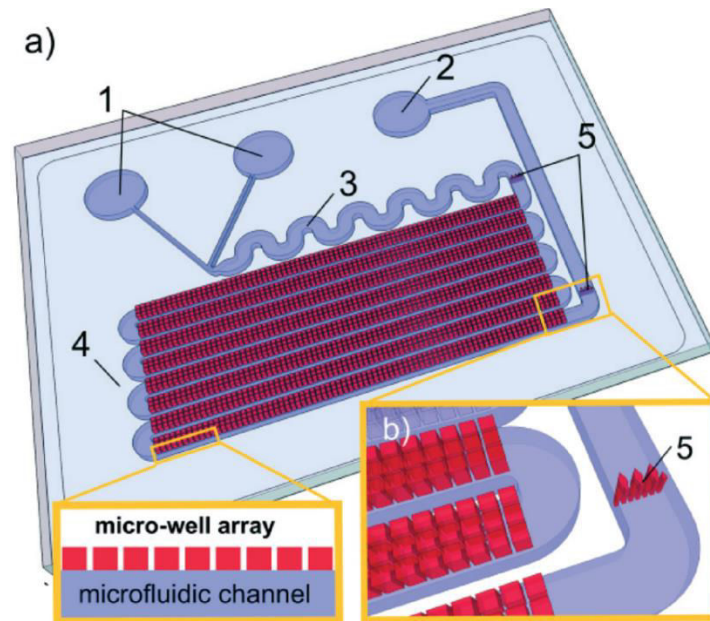


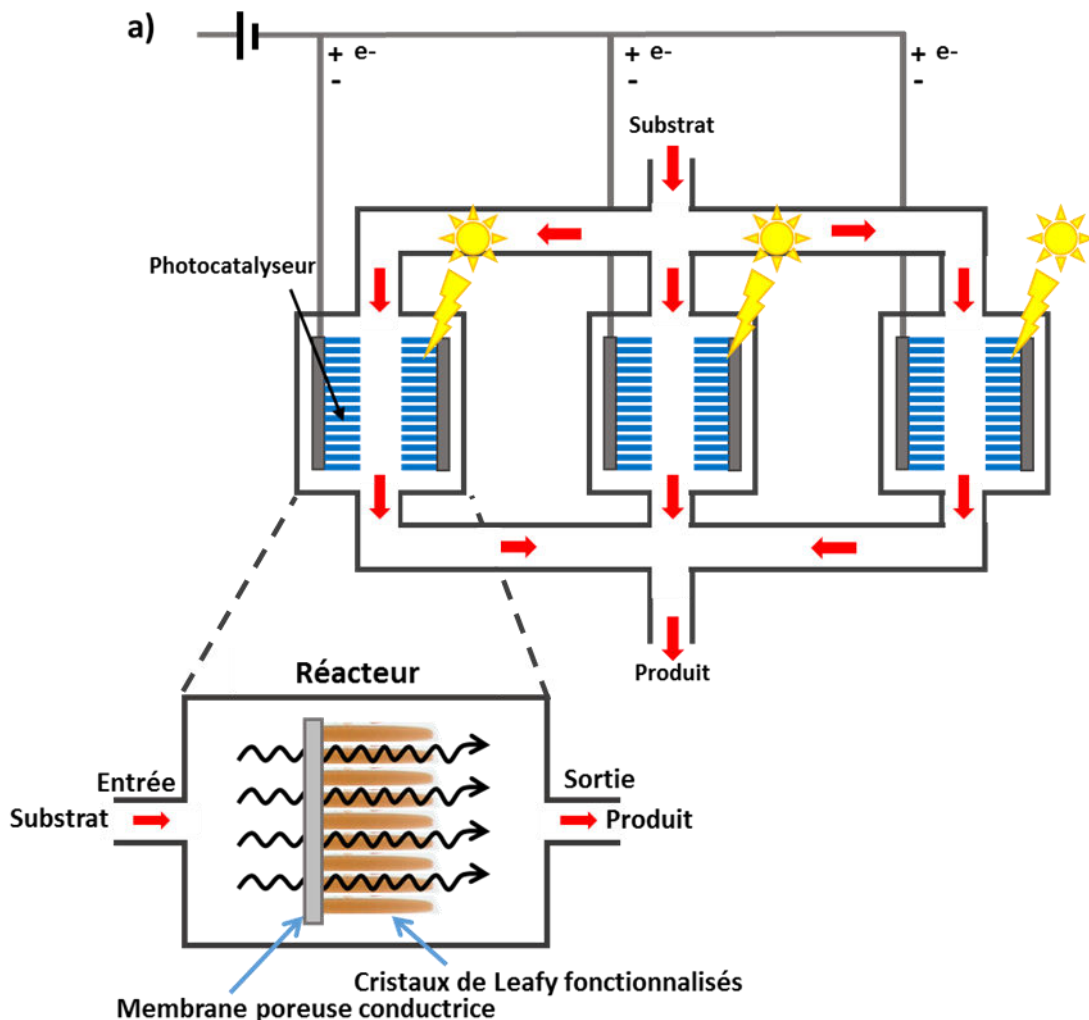
Figure 7: Puce microfluidique pour la production de cristaux de protéine. a-1) Orifices d'entrée; a-2) orifice de sortie ; a-3) mélangeur passif en zigzag ; a-4) canal en serpentins pour le stockage et la croissance des cristaux ; a-5) filtres PDMS. Encart à gauche : coupe transversale du système de micropuits .b) Détail du réseau de micropuits et du Filtre PDMS .Reproduit de la réf¹⁷¹

Pour aller plus loin, en s'inspirant de ce type de stratégie, le développement d'une puce microfluidique présentant des surfaces de croissance conductrices permettrait de s'affranchir d'oxydants ou de réducteurs chimiques. En effet, étant donné que toutes les catalyses envisagées (réduction de protons en hydrogène) ou effectuées (oxydation de sulfures) au cours de cette thèse nécessite soit des donneurs soit des accepteurs d'électrons sacrificiels, il serait particulièrement utile de pouvoir s'affranchir de ce type de molécules. En effet, afin de s'inscrire au mieux dans une démarche de chimie durable, l'économie d'atomes ainsi que la diminution des déchets font partie des 12 principes fondateurs de la chimie verte présentée par Anastas.^{1,172}

Pour ce faire, en collaboration avec P.H. Elchinger (Symmes), il est envisagé de réaliser l'autoassemblage de la protéine Leafy sur des surfaces conductrices (Au, C). Cette fonctionnalisation devrait nous apporter deux propriétés particulièrement utiles. Il serait alors possible de réaliser de la (photo)électrocatalyse et ainsi s'affranchir de ces donneurs/accepteurs d'électrons sacrificiels. Ensuite, l'autoassemblage sur de telles surfaces devrait permettre une aisance non négligeable dans la manipulation de ces objets biohybrides. En montrant qu'il était possible de réaliser de tels auto-assemblages et que, point

important, la protéine conservait sa structure en nid d'abeille, les résultats préliminaires obtenus dans l'équipe partenaire de P.H. Elchinger sont particulièrement encourageants.

A plus long terme, ces catalyseurs supportés pourraient être internalisés au sein de microréacteurs permettant ainsi une modularité importante. Par exemple, pour une application industrielle en chimie fine, le rendement réactionnel pourrait être accru par un montage en parallèle (Figure 8a). Une utilisation en série (Figure 8b) serait également envisageable pour la réalisation de réactions tandem à l'image des réactions de cascades enzymatiques en biologie.



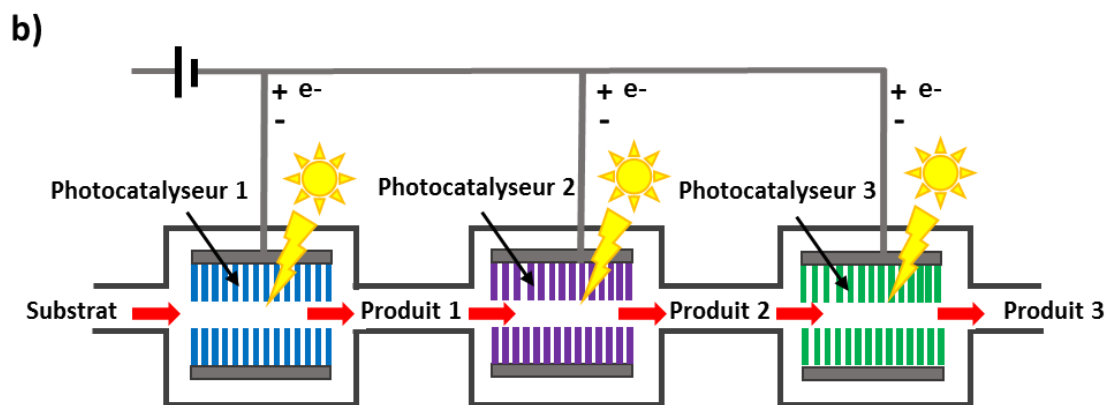


Figure 8 : Systèmes de photoréacteurs envisageables avec les autoassemblages protéiques sur surfaces conductrices. a) montage en parallèle des réacteurs pour une augmentation de la quantité produite. b) Montage en série de différents photocatalyseur pour la chimie tandem.

Epilogue

D'un point de vue plus personnel, j'ai trouvé ce travail de thèse particulièrement enrichissant. J'ai eu la chance de commencer un sujet où rien n'avait encore été fait, ce qui laisse une grande part à l'autonomie et à la créativité. J'ai ainsi pu bénéficier d'un cadre de travail élargi qui m'a laissée suffisamment de liberté pour orienter le projet selon mes affinités et ma curiosité.

La pluridisciplinarité est un autre aspect très positif de ce projet. En effet, pour être mené à bien nous avons dû interagir avec beaucoup d'autres chercheurs et développer de nouvelles collaborations. Cela permet d'élargir son horizon scientifique, de découvrir des approches et des techniques différentes et d'un point de vue humain c'est aussi très enrichissant.

En parallèle de ma thèse, j'ai également eu l'opportunité d'effectuer un contrat de doctorat conseil pour la société NMR-Bio. Cette expérience m'a été particulièrement profitable, j'ai ainsi pu avoir un lien avec le milieu de l'entreprise et travailler sur des thématiques complètement différentes avec d'autres méthodologies et objectifs.

CHAPITRE V

DOCTORAT-CONSEIL: SOCIETE NMR-BIO

Chapitre V : Doctorat-Conseil : Société NMR-Bio

Le contrat de doctorat-conseil est une mission d'expertise réalisée auprès d'une entreprise et correspond à 16% de l'activité du doctorant soit 32 jours par an. J'effectue ce contrat au sein de la société NMR-Bio pour laquelle j'ai déjà réalisé précédemment deux contrats d'ingénierie de recherche (janvier 2013 - juin 2014 et juin à décembre 2015).

Ma mission se décomposait en 2 axes à savoir :

- Le développement d'une synthèse permettant le marquage de l'acétolactate par des isotopes stables (^{13}C , D).
- Le développement de la synthèse de l'alanine sélectivement marquée.

I. [La société NMR-Bio \(http://www.nmr-bio.com/\)](http://www.nmr-bio.com/)

Depuis 2009, la collaboration académique entre les équipes de Jérôme Boisbouvier (Biomolecular NMR Spectroscopy Group, IBS) et d'Olivier Hamelin (BioCE, LCBM) a permis le développement de solutions technologiques de marquage isotopique et de protonation sélective des protéines afin de repousser les limites résolutes de la résonance magnétique nucléaire (RMN) et ainsi être en mesure de visualiser la structure et la dynamique de macromolécules protéiques.

C'est dans ce contexte qu'est née la société NMR-Bio afin qu'un public plus large, académique comme industriel, puissent bénéficier de ces technologies.

NMR-Bio a débuté par la production et la distribution de précurseurs sous forme de kits pour le marquage sélectif [^{13}C , ^1H] des groupements méthyles présents dans les protéines [^{12}C , D] (Figure V.1). Actuellement, 85 kits prêts à l'emploi sont proposés par NMR-Bio permettant un marquage isolé ou combinatoire de chacun des neuf types de méthyles présents dans les protéines (Figure V.5).



Figure V.1 : Exemple de kits NMR-Bio

La société a ensuite évolué pour proposer un service complet pour l'étude par RMN de systèmes protéiques de hauts poids moléculaires (Figure V.2).

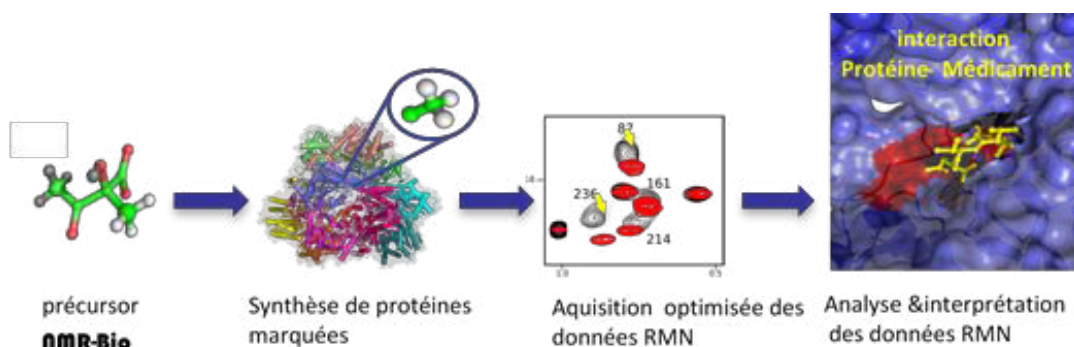


Figure V.2 : Offre de service NMR-Bio pour l'étude structurale et dynamique de protéines.

La société s'investit également dans la R&D visant à étendre l'approche du marquage sélectif à de nouveaux systèmes d'expression tels que les cellules de mammifères, un système d'expression très largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique.

II. Etudes structurales des protéines par RMN

La résonance magnétique nucléaire est une technologie de pointe permettant entre autre l'étude des processus biologiques. Elle est utilisée notamment pour la caractérisation structurale et dynamique de macromolécules biologiques, mais également pour étudier les interactions avec leurs partenaires physiologiques.

A la différence de la diffraction des rayons X qui nécessite d'une part l'obtention de cristaux de protéine, étape relativement incertaine pouvant être longue, cette approche présente en plus l'avantage d'être réalisée en solution donc plus proche des conditions du vivant.

A. Importance du marquage spécifique des méthyles H, D, ^{13}C pour l'étude de protéines par RMN

La RMN standard est limitée aux protéines de petites tailles moléculaires (≤ 30 kDa) en raison des atomes d'hydrogène. En effet, ce dernier bien qu'indispensable à l'analyse des protéines par RMN va, s'il est présent en trop forte concentration, entrainer une augmentation du temps de relaxation induisant une diminution de l'intensité du signal. Ainsi plus une protéine présentera un poids moléculaire élevé plus son signal RMN sera faible. Ce phénomène est visible sur les spectres RMN bidimensionnels hétéronucléaire (HMQC ^1H , ^{13}C , Figure V.3), ou le signal de l'ubiquitine (Figure V.3, gauche), une protéine de faible masse (8,5 kDa) est

parfaitement exploitable alors que dans les mêmes conditions celui de la protéine TET2 beaucoup plus grosse (468 kDa) est quasiment nul (Figure V.3, droite).

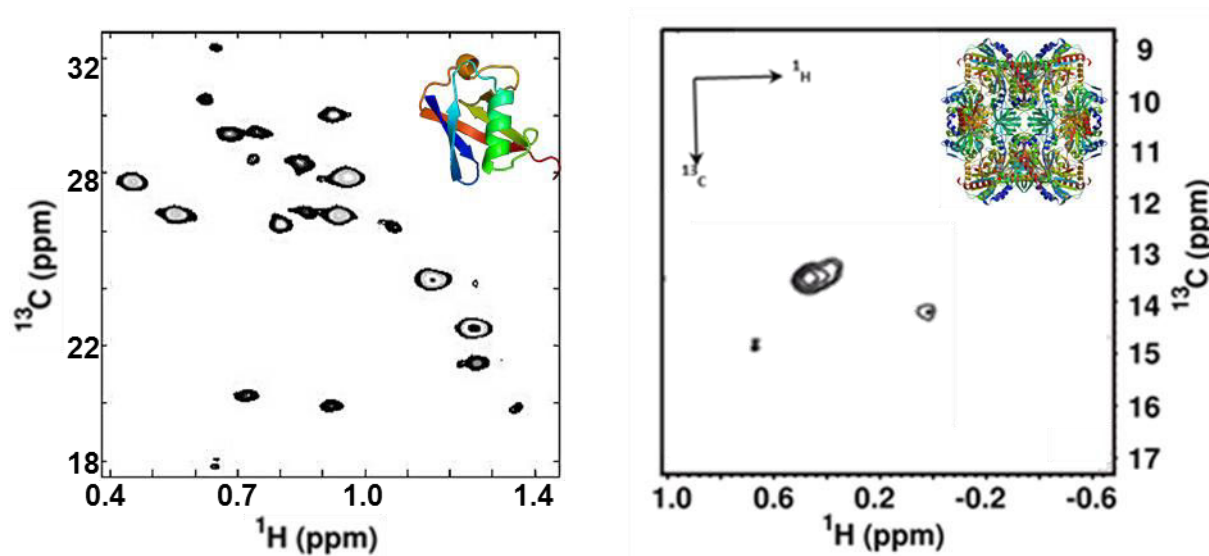


Figure V.3 : Comparaison entre les spectres RMN 2D hétéronucléaire HMQC (^1H , ^{13}C) d'une protéine de 8,5 kDa protonée (ubiquitine, code PDB : 1UBQ) (gauche) et d'une protéine de 468 kDa protonée. (TET2, code PDB : 1YOR) (droite).

Les récents progrès dans le domaine du marquage isotopique spécifique ($^{13}\text{CH}_3$, $^{13}\text{CHD}_2$ et $^{12}\text{CD}_3$) des groupements méthyles couplés au développement technologique de la RMN (spectromètre haut champs cryogénique, expérience Methyl-TROSY) ont permis de rendre possible l'étude de protéines de tailles bien plus importantes (≥ 100 kDa).

Cette stratégie de marquage repose sur le remplacement de tous les atomes d'hydrogène présents dans la protéine par du deutérium à l'exception de certaines positions sur des méthyles cibles, qui elles restent protonées entièrement ou partiellement. Ce marquage permet d'obtenir un signal RMN présentant une grande sensibilité et une haute résolution et rend ainsi possible l'attribution des différents acides aminés dont les méthyles sont sélectivement protonés conduisant à la détermination de la structure. Par exemple dans la Figure V.4b le marquage sélectif des méthyles des alanines a permis de visualiser les 30 signaux correspondant aux 30 résidus alanine contenus dans la protéine. En l'absence de marquage quasiment aucun signal n'est visible (Figure V.4a).

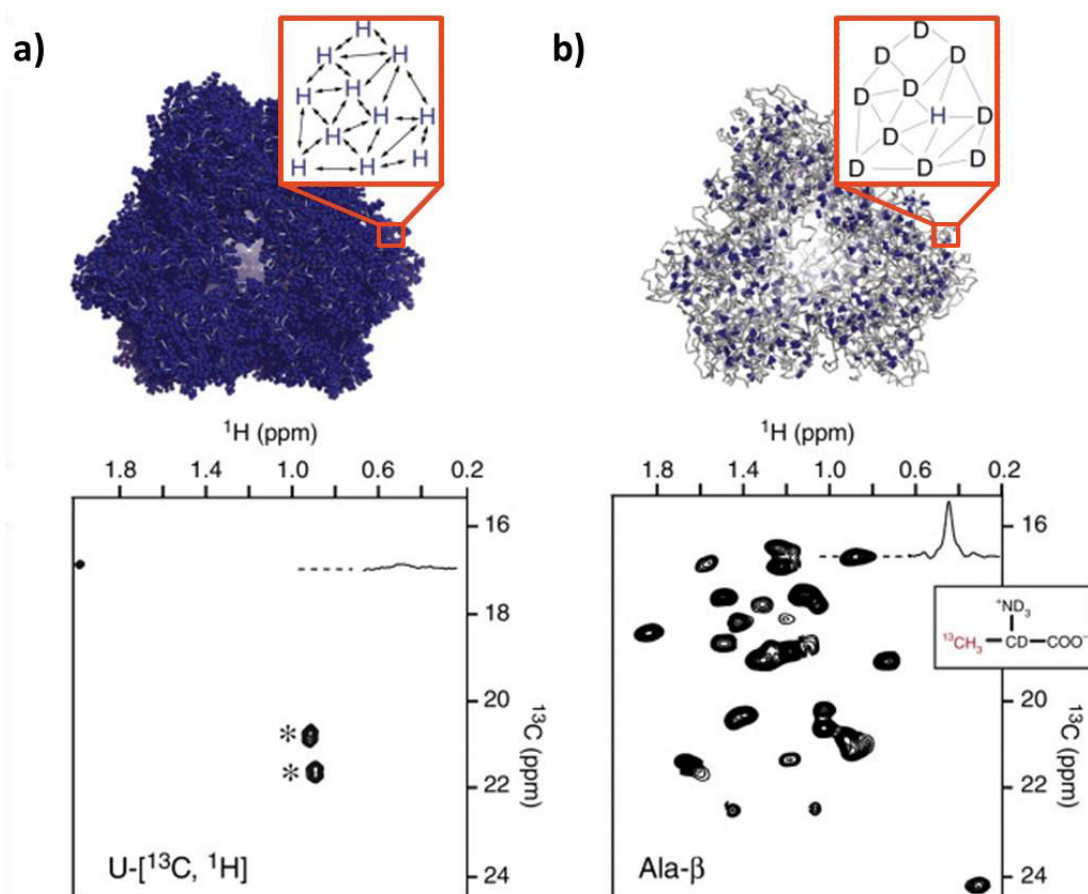


Figure V.4 : Comparaison entre les spectres RMN 2D hétéronucléaire HMQC (^1H , ^{13}C) d'une protéine de 500 kDa (TET2, code PDB : 1YOR) (a) protonée et uniformément ^{13}C ou (b) entièrement deutérée avec un marquage sélectifs $^{13}\text{CH}_3$ sur les méthyles de l'alanine. Les boules bleues représentent les atomes d'hydrogène. *signaux de la valine 4. Reproduit de la réf¹⁷³

Dans la nature, il existe six acides aminés portant au moins une fonction méthyle sur leurs chaînes latérales : la leucine, la valine, l'alanine, la thréonine, l'isoleucine et la méthionine (Figure V.5). Ces trois derniers possédant chacun deux méthyles différenciés.

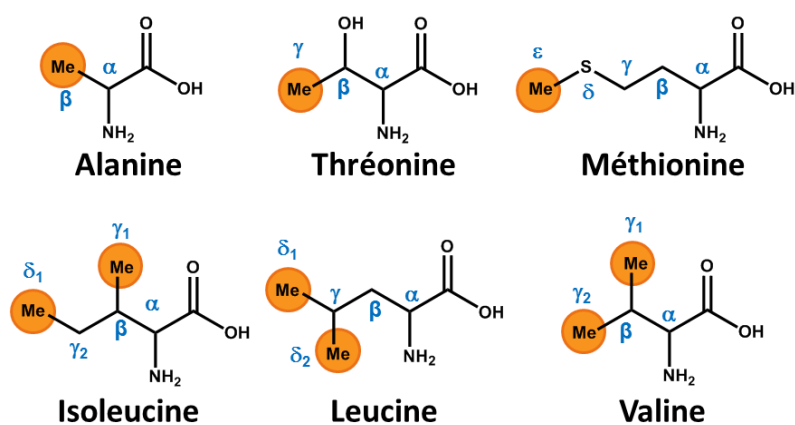


Figure V.5 : Les six acides aminés méthylés existants naturellement et utilisables pour le marquage isotopique spécifique sur les méthyles.

L'intérêt serait de pouvoir disposer de chacun d'eux sélectivement marqué sur le ou un des groupements méthyles afin de pouvoir les utiliser seul ou en combinaison selon l'objectif de l'étude RMN.

C'est dans ce contexte qu'en 2009, la collaboration entre les équipes de Jérôme Boisbouvier et d'Olivier Hamelin a commencé.

B. Développement des synthèses de précurseurs

1. Marquage stéréospécifique des méthyles de la leucine et de la valine

La valine et la leucine sont des cibles d'intérêt car elles peuvent représenter jusqu'à 50% des cœurs hydrophobes et poches catalytiques des protéines.¹⁷⁴ Ainsi, obtenir des informations structurales sur ces positions stratégiques présente un intérêt considérable dans la connaissance des processus biochimiques.

Elles ont également la particularité de posséder deux groupements méthyles et d'être produites par la même voie métabolique dans *E. coli* (Figure V.7, en jaune) avec, comme intermédiaire commun l' α -cétoisovalérate provenant de l'acétolactate.

Au début des années 2000, les premiers protocoles développés pour le marquage sélectif des méthyles de la leucine et de la valine reposaient sur l'introduction de l' α -cétoisovalérate (acide 2-oxo,3-méthyl butanoïque) dont les deux groupements méthyles étaient marqués $^{13}\text{CH}_3$. Cependant, cette technique ne permet pas de marquer de façon différenciée les deux groupements méthyles de la leucine et de la valine qui sont des groupements prochiraux possédant des configurations proR et proS (Figure V.6).¹⁷⁵ Cette approche s'est avérée inefficace pour l'étude des assemblages protéiques de grande taille,

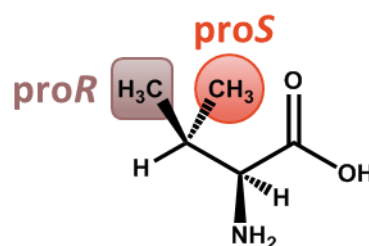
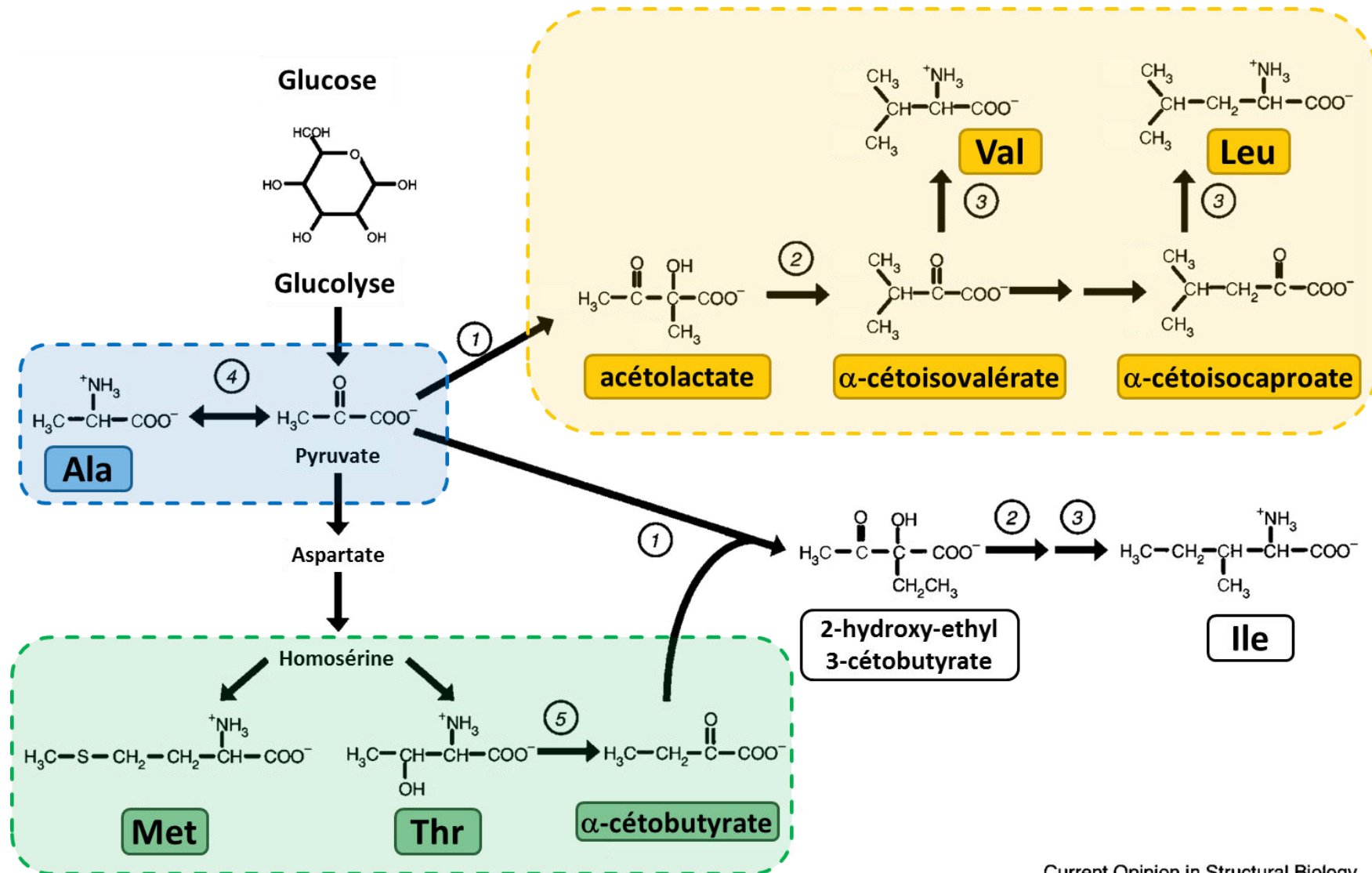


Figure V.6 : Identification des méthyles prochiraux proS (en rouge) et proR (en marron) de la valine.

car la sensibilité des expériences RMN est limitée par les très fortes interactions dipolaires ^1H - ^1H intrarésidu entre les groupes méthyles prochiraux.



Current Opinion in Structural Biology

Figure V.7 : Voies de biosynthèses simplifiées des acides aminés méthylés dans *E. coli*. Biosynthèse de la leucine et valine (jaune). Biosynthèse de la thréonine (vert. Biosynthèse de l'alanine (bleu). Traduit de la réf¹⁷³

Plus tard, il a été montré que l'utilisation de l' α -cétoisovalérate ou un seul des deux méthyles est protoné et l'autre deutéré permet d'améliorer significativement la sensibilité et la résolution des spectres methyl-TROSY de grandes protéines. Cependant le marquage n'étant pas stéréosélectif, deux signaux correspondant aux méthyles proR et proS sont encore détectés (Figure V.9, spectre noir).^{176,177}

La stratégie adoptée par le Dr. Jérôme Boisbouvier consistait donc cette fois à utiliser l'acétolactate précurseur de l' α -cétoisovalérate dans lequel les deux méthyles sont différenciés. Il avait en effet été montré que la conversion de l'acétolactate de configuration *S* en α -cétoisovalérate se faisait de façon stéréospécifique (Figure V.7, jaune). Ainsi le méthyle porté par le carbone 2 de l'acétolactate devenait le méthyle proS de l' α -cétoisovalérate puis le proS de la leucine et de la valine (Figure V.8); le méthyle en C-4 devenant le méthyle proR. L'autre énantiomère de l'acétolactate (isomère *R*) n'est quant à lui ni toxique pour les cellules en culture, ni impliqué dans la synthèse d'autres acides aminés ce qui entrainerait des fuites métaboliques et donc des taches de corrélation supplémentaires sur le spectre. Par conséquent, la synthèse des acétolactates sélectivement marqué pourrait se faire en version racémique donc plus simplement et moins coûteux qu'en version chirale.

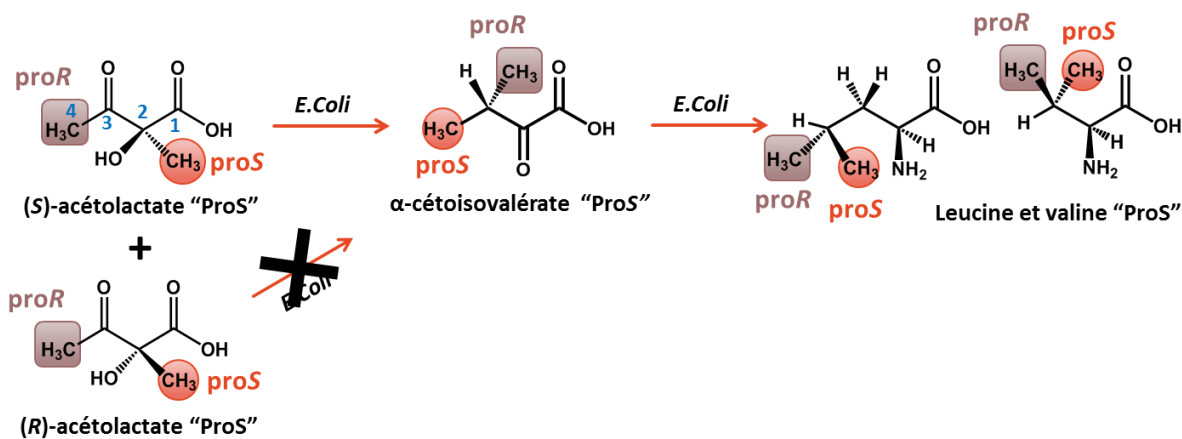


Figure V.8 : Stratégie de marquage stéréosélectif des méthyles proS de la leucine et valine via l'acétolactate proS.

Ce marquage par rapport à l'utilisation de α -cétoisovalérate marqué ^{13}C sur un seul méthyle a pu améliorer de façon significative la sensibilité (jusqu'à 4 par rapport aux précurseurs existants) des spectres [^1H , ^{13}C] methyl-TROSY tout en les simplifiant comme ceci est montré par la Figure V.9.

En effet l'utilisation d' α -cétisovalérate ou un seul méthyle est marqué ^{13}C conduit à un mélange d'isomères (Leucine proR et proS, valine proR et proS) dont tous les méthyles sont observables (Figure V.9, spectre noir). Inversement l'utilisation d'acétolactate ou seul le méthyle porté par le carbone 2 est marqué conduit à deux fois moins de produits permettant de distinguer les méthyles proS de la valine et de la leucine (Figure V.9, spectre rouge).

Cette technique s'avère donc particulièrement utile pour l'étude des interactions dans les grands assemblages protéiques. ¹⁷⁸

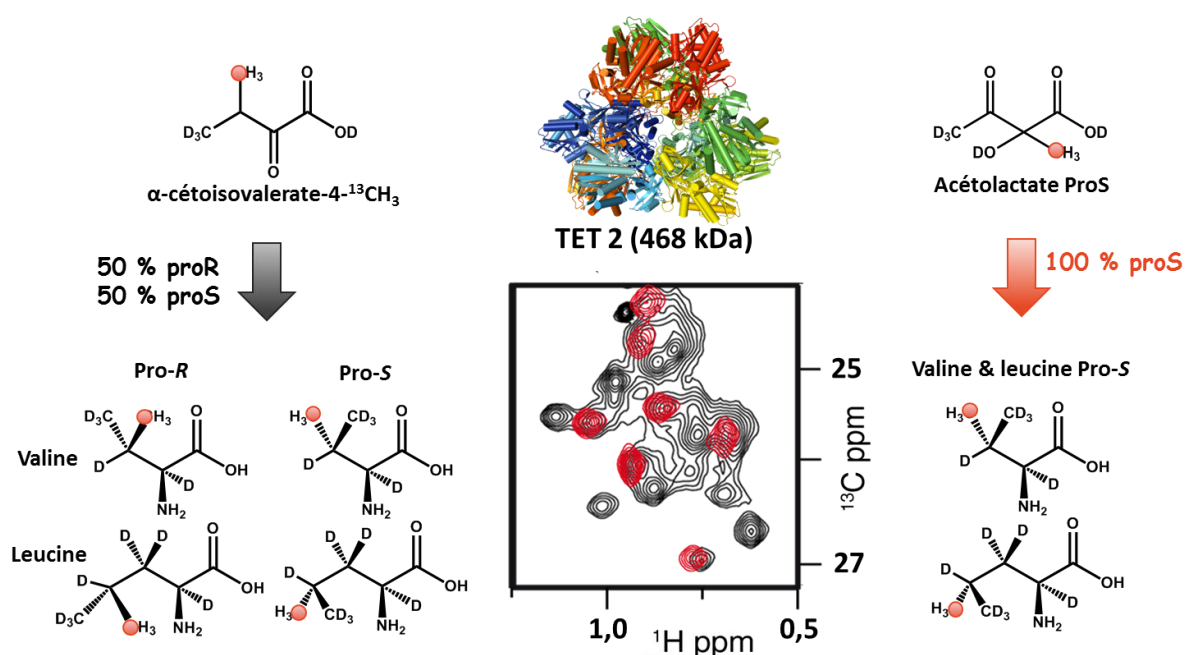


Figure V.9 : Comparaison des spectres RMN Méthyl-TROSY de la protéine TET2 avec marquage spécifique des méthyles de la leucine et de la valine par l' α -cétisovalérate-4- $^{13}\text{C}_3$ (en noir) ou par l'acétolactate ProS (en rouge). Inspirée de la réf¹⁷⁸

a) Synthèse racémique de l'acétolactate deutéré sélectivement marqué ^{13}C

Après une première mise au point suivie d'un certain nombre d'optimisations, la synthèse racémique développée s'effectue finalement en trois étapes relativement simples décrites dans la Figure V.10.

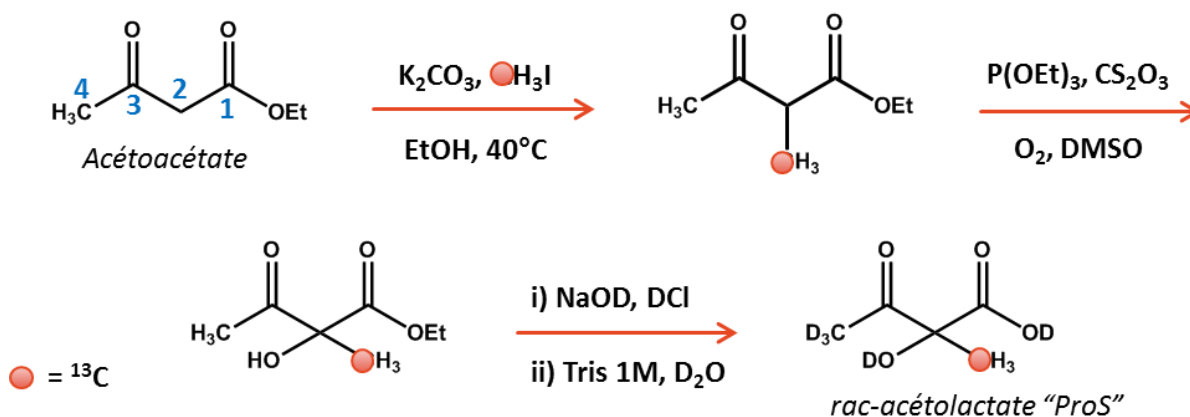


Figure V.10 : Synthèse de l'acétolactate: Exemple de la synthèse de l'acétolactate ProS (acide 2- ^{13}C methyl-2-hydroxy-4- $[\text{D}_3]$ -butanoïque).

La première étape est une alkylation de l'acétoacétate avec du $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ en présence de carbonate de potassium.¹⁷⁶ Le produit alkylé obtenu est ensuite oxydé grâce à l'oxygène moléculaire en présence de quantité catalytique de carbonate de césium et de triéthylphospite.¹⁷⁹ La dernière étape est réalisée en présence d'une solution de NaOD dans D_2O (2,5M) et permet l'hydrolyse de l'ester mais aussi dans le cas des composés proS de procéder à l'échange proton/deutérium sur le C-4 qui deviendra le méthyle proR.

Cette étape est la plus délicate et risquée de la synthèse de tous les dérivés acétolactates sélectivement marqués. Lorsque la solution est laissée trop longtemps en milieu basique ou lorsque la solution de soude est ajoutée trop rapidement conduisant à un saut de pH rapide, une transposition du groupement carboxyle se produit (Figure V.11). De façon intéressante mais malheureuse, cette migration sur le carbonyle en C-3 conduit de nouveau à une molécule d'acétolactate mais dans laquelle les deux méthyles ont été interchangés.

Dans cette situation, d'une part les deux méthyles proR et proS de la leucine et de la valine seront marqués ^{13}C mais également, le méthyle $^{13}\text{CH}_3$ initialement en position 2 sera en position 4, position énolesable entraînant l'échange non contrôlé des H en D.

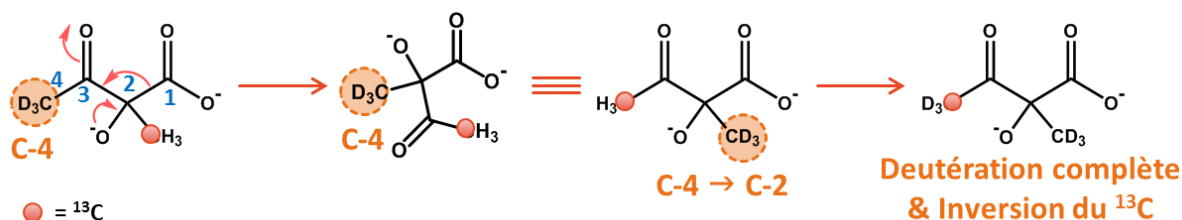


Figure V.11 : Mécanisme de transposition du carbonyle lors de l'échange H/D en C-4.

Cette synthèse a permis d'accéder à cinq dérivés acétolactate portant des marquages isotopiques différents (Figure V.12).

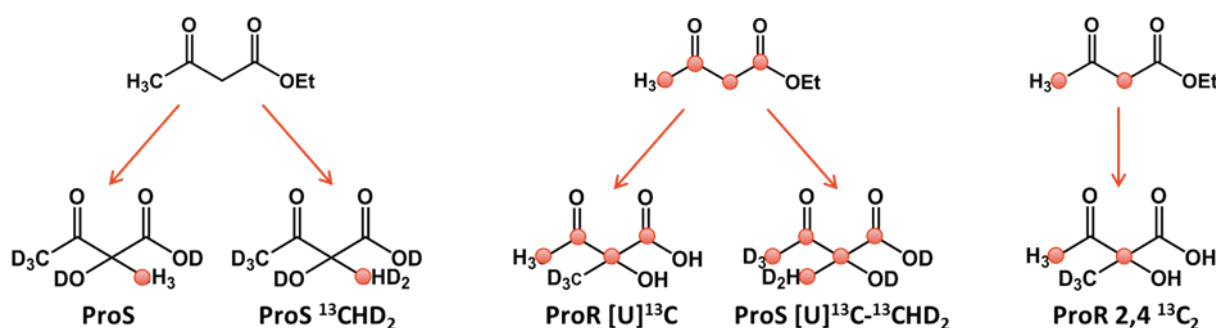


Figure V.12 : Les cinq acétolactates synthétisés à partir des acétoacétates commerciaux.

Cependant, bien que cette approche soit efficace, la diversité des marquages disponibles pour l'acétolactate est conditionnée par le coût et la disponibilité commerciale de l'acétoacétate, de l'iodométhane et de leurs divers dérivés marqués (Tableau V.1). Actuellement trois types de marquages sont disponibles : sans marquage, uniformément ^{13}C et marquage ^{13}C sur les carbones 2 et 4 pour l'acétoacétate et $^{13}\text{CH}_3$, $^{13}\text{CHD}_2$, $^{13}\text{CD}_3$ pour l'iodométhane.

Composé	Merck (Prix catalogue)
1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$ acétoacétate d'éthyle	494€ (500mg)
2,4- $^{13}\text{C}_2$ acétoacétate d'éthyle	445€ (500mg)
CD_3I	327€ (50mg)
$^{13}\text{CHD}_2\text{I}$	1130€ (5g)
$^{13}\text{CH}_3\text{I}$	2350€ (100g)

Tableau V.1 : Prix des différents composés impliqués dans la synthèse des acétolactates marqués.

Afin de valoriser le travail d'innovation et de développement de ces précurseurs marqués, un brevet a été déposé en 2010, protégeant la synthèse de 720 dérivés marqués de l'acétolactate présentant toutes les combinaisons de marquages possibles, ainsi que leur application RMN.¹⁸⁰

Suite à ce brevet, la société NMR-Bio a été créée afin de proposer au plus grand nombre ces technologies de marquages isotopiques innovantes.

b) Développement d'une synthèse pour le marquage sélectif ^{13}C , D de l'acétoacétate (mission I)

Devant le succès grandissant des kits, il est rapidement devenu nécessaire de proposer de nouveaux types de marquage et de nouveaux composés afin d'obtenir de nouvelles informations structurales et d'étoffer le catalogue de produits disponibles à la vente.

Plus particulièrement, pour pouvoir élargir la gamme disponible en acétolactate, il était devenu important de s'affranchir de la dépendance aux acétoacétates commerciaux, d'autant plus que seuls deux marquages sont disponibles.

Ainsi, la mise au point d'une voie de synthèse d'acétoacétate marqué devenait une nécessité pour accéder à une plus grande variété de marquage des acétolactates et donc de leucine et valine. Un exemple est donnée dans Figure V.13 à partir du 1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ -acétoacétate de méthyle.

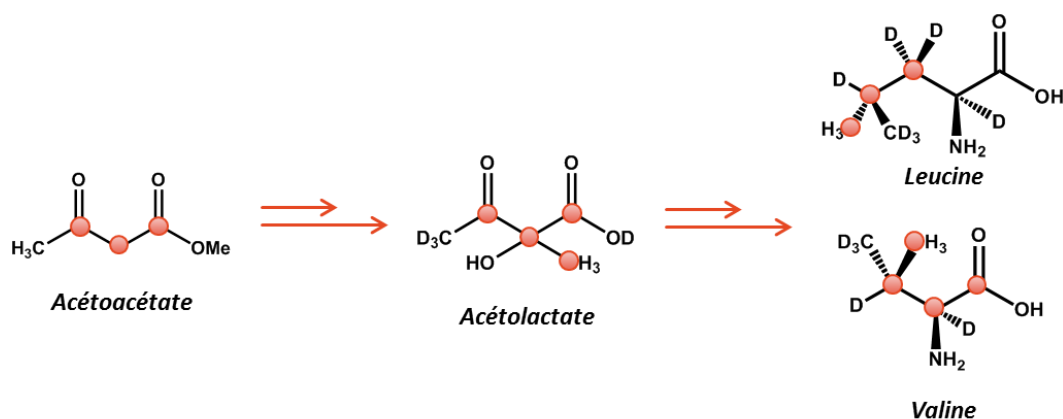


Figure V.13 : Mission I : Développement d'une synthèse pour le marquage sélectif ^{13}C , D de l'acétoacétate. Exemple du 1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ -acétoacétate de méthyle.

Pour accéder à l'acétolactate, trois stratégies s'offraient à nous :

- La condensation pouvait être réalisée entre un chlorure d'acétyle et de l'acétate de méthyle en milieu basique (Figure V.14a) comme montré par Lugtenburg.¹⁸¹

- Une seconde approche, rapportée par Scherling¹⁸² et Harris¹⁸³, consiste à réaliser la condensation d'un dérivé de type β -diester sur un chlorure d'acétyle, suivie d'une décarboxylation (Figure V.14b).

- Une troisième voie décrite par Wang consistant à condenser de l'acétonitrile sur l'acétate de méthyle (Figure V.14c).¹⁸⁴

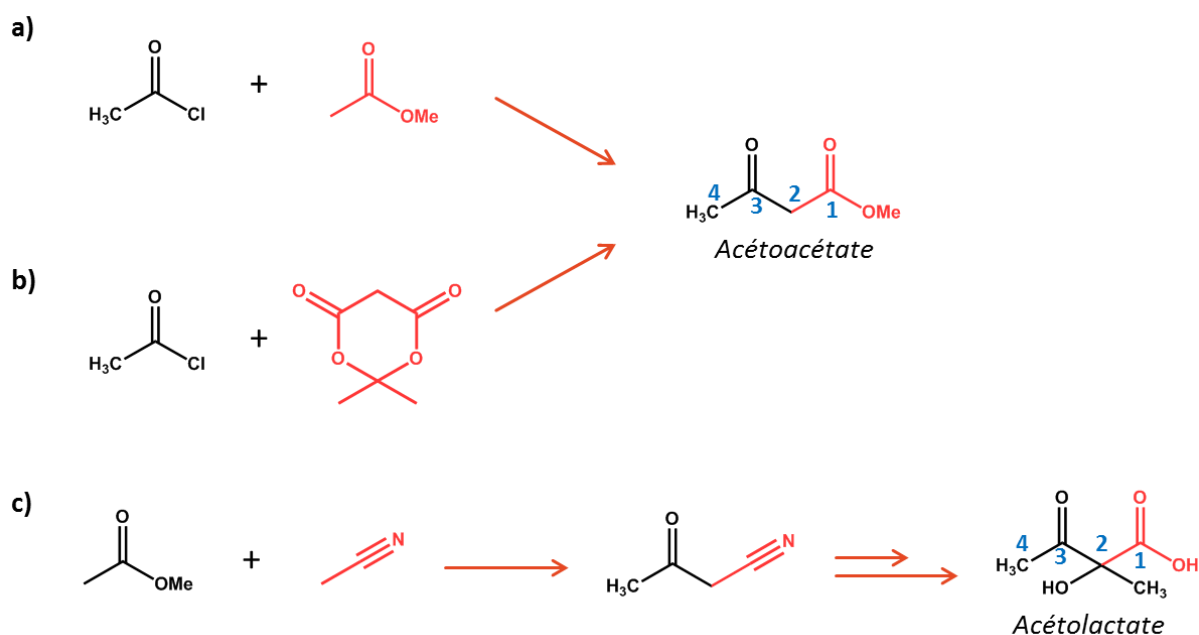


Figure V.14 : Synthèses possibles pour l'acétoacétate présentant un marquage dissymétrique. a) Condensation de l'acétate de méthyle sur le chlorure d'acétyle. b) Condensation d'un dérivé β -diester sur le chlorure d'acétyle. c) Condensation de l'acétonitrile sur l'acétate de méthyle.

Nous concernant, le choix de la synthèse a été dicté par la disponibilité commerciale et la diversité de marquages isotopiques des composés de départ. Etant donné que tous les dérivés marqué ^{13}C de l'acétate de méthyle et du chlorure d'acétyle (position 1 et/ou 2) sont disponibles ou facilement accessibles, la première voie a été retenue (Figure V.14a).¹⁸¹

Cette synthèse s'effectue *via* la formation de l'anion de l'acétate de méthyle en milieu basique (LiHMDS) et à basse température avant l'ajout du chlorure d'acétyle. L'acétoacétate de méthyle issu directement de cette condensation possédant des protons plus acide que ceux de l'acétate de méthyle de départ, deux équivalents de base sont nécessaires afin d'éviter la déprotonation du produit obtenu par l'anion de l'acétate de méthyle (Figure V.15).

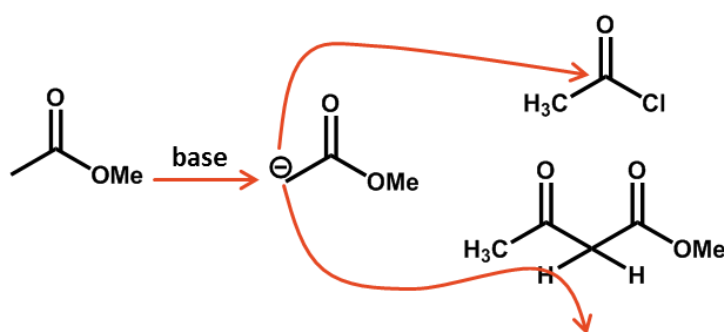


Figure V.15 : Mécanisme réactionnel expliquant la nécessité d'ajouter deux équivalents de base.

Dans ces conditions, un intermédiaire carbanionique est obtenu avant hydrolyse acide conduisant au produit désiré (Figure V.16).

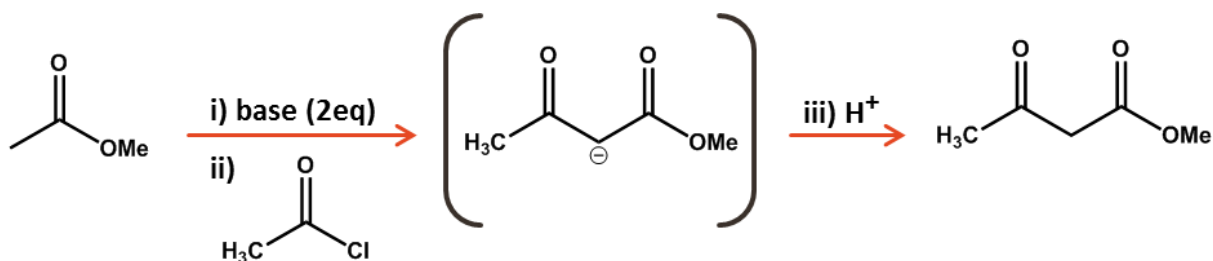


Figure V.16 : Voie de synthèse de l'acétoacétate proposée par Lugtenburg.¹⁸¹

La première étape de la synthèse de l'acétolactate à partir de l'acétoacétate étant la réaction d'alkylation (Figure V.10, étape 1), la formation de ce carbanion intermédiaire permettait d'envisager une synthèse "one pot" conduisant directement au composé acétoacétate méthylé. Pour cela, il suffisait de quencher le milieu réactionnel directement avec du iodométhane plutôt qu'avec une source de proton (Figure V.17).

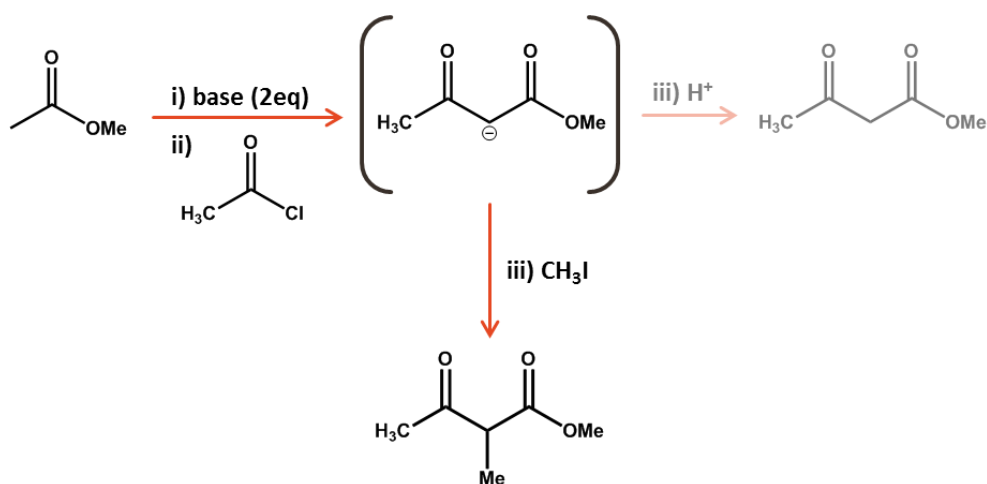


Figure V.17 : Voie de synthèse envisagée.

Différents essais ont été menés avec des composés non marqués afin de trouver les meilleures conditions réactionnelles. Ainsi ont été testés différentes quantités de base et de iodométhane, des températures et des temps réactionnels différents aussi bien lors de l'étape de déprotonation de l'acétate d'éthyle que dans les étapes d'acylation et de méthylation. Les résultats sont présentés dans la Figure V.18 et montrent que, quelles que soient les conditions, un mélange d'acétoacétate non méthyly, méthyly et diméthyly a toujours été observé dans des proportions variables et non favorables au produit désiré.

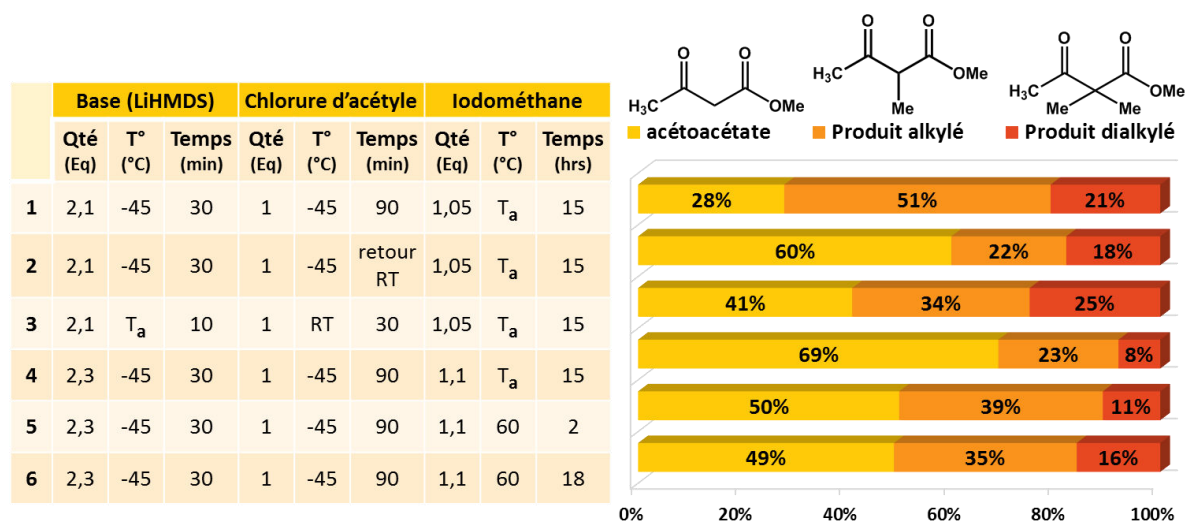


Figure V.18 : Récapitulatif des conditions testées pour le développement de la synthèse "one pot".

Devant cette problématique, il a été décidé de revenir à la synthèse initiale, qui nous a permis d'accéder à l'acétoacétate marqué ^{13}C sur les carbones 1,2 et 3 avec un très bon rendement de 98% par condensation du 1,2- $^{13}\text{C}_2$ éthanoate d'éthyle sur le 1- ^{13}C chlorure d'acétyle (Figure V.19).

Les étapes suivantes (alkylation, hydroxylation et hydrolyse) ont permis d'accéder à deux nouveaux dérivés d'acétolactates correspondant avec des rendements équivalents à ceux obtenus dans les précédentes synthèses.

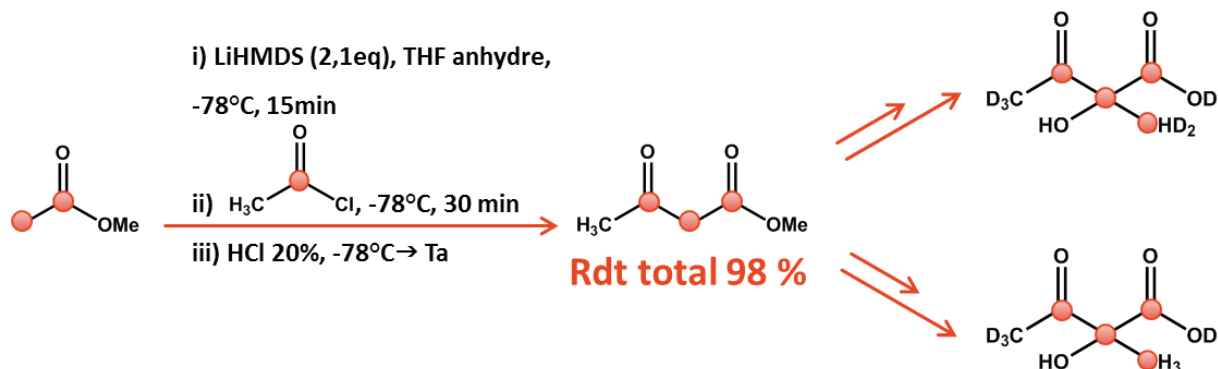


Figure V.19 : Voie de synthèse finale pour le marquage sélectif de la chaîne carbonée d'acétoacétate.

2. Synthèse stéréosélective de la thréonine sélectivement marquée $^{13}\text{C}_3$

La synthèse chimique de la *L*-thréonine marquée est particulièrement complexe en raison de la présence de deux centres stéréogènes dans la molécule auxquelles vient s'ajouter la difficulté à introduire sélectivement les isotopes (^{13}C , D) sur des positions spécifiques.

In vivo dans *E. coli*, la *L*-phosphohomosérine est convertie en thréonine par la thréonine synthétase (EC. 4.2.3.1) (Figure V.7, vert). Une première stratégie pourrait être de synthétiser ce précurseur qui serait ensuite converti *in vitro* en thréonine.¹⁸⁵ Cependant cette approche présente deux inconvénients majeurs. Tout d'abord, bien que la synthèse chimique de la phosphohomosérine ait déjà été décrite¹⁸⁶, les protocoles proposés semblent difficiles à mettre en place à grande échelle avec des rendements acceptables. Ensuite l'homosérine est également un intermédiaire de la méthionine ce qui conduirait donc inévitablement au marquage de ces deux acides aminés.

Pour ces raisons, nous avons donc décidé de synthétiser directement la *L*-thréonine marquée, d'autant plus qu'en 1997, O'Hagan avait décrit la synthèse énantiosélective de la (2*S*,3*S*)-4-fluorothréonine et de la *L*-thréonine en trois étapes (Figure V.20).^{187,188}

La première étape fait intervenir la condensation d'un chlorure d'acide sur une copule chirale ((R)-(-)-2-(tert-Butyl)-3-méthyl-4-oxoimidazolidinium trifluoroacétate) servant d'inducteur de chiralité aussi bien pour la première étape que pour la seconde de réduction du groupement carbonyle. Enfin, une étape d'hydrolyse de la copule dans des conditions particulièrement drastiques (HCl 10M, 100°C, 72h) conduit au produit désiré sans isomérisation des deux centres stéréogènes.

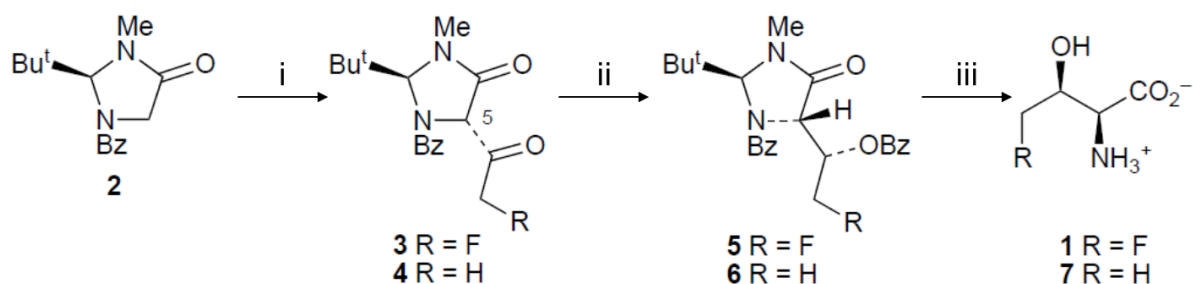


Figure V.20 : Voie de synthèse décrite par O'Hagan pour la fluorothréonine. i. LDA, FCH₂COCl (CH₃COCl pour **4**), -100°C, 57%; ii. NaBH₄, MeOH, 20°C, 5min, 67%; iii. HCl 10M, 100°C, 72h, 64%. Reproduit de la réf¹⁸⁸

Le premier dérivé marqué de la thréonine que nous avons ciblé est représenté dans la Figure V.21. La synthèse de ce composé représente trois difficultés majeures à savoir :

i) L'introduction d'un deutérium sur le carbone 2 de façon hautement stéréosélective.

ii) L'introduction d'un second deutérium sur le carbone 3 également de façon hautement stéréosélective.

iii) L'introduction d'un ¹³CH₃ en position 4 alors que les autres carbones sont ¹²C.

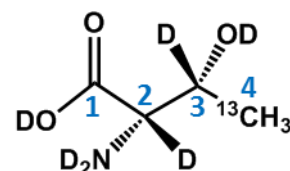


Figure V.21 : L-thréonine deutérée marquée ¹³CH₃.

Les premiers tests ayant été réalisés sans marquage pour une question évidente de coût, il semblait possible d'introduire l'isotope D sur le carbone 2, lors de l'étape finale d'hydrolyse en présence de DCl au lieu de HCl. Malheureusement, malgré ces conditions particulièrement rudes, aucun échange H/D n'a pu être observé. Par conséquent, nous avons jugé pertinent de l'introduire directement sur la copule chirale avant l'étape d'acylation (Figure V.22).

Ainsi, le dérivé de benzoyle (**2**) a été obtenu dans des conditions standards avec un rendement élevé. Les protons énolisables ont ensuite pu être échangés quantitativement par du deutérium dans des conditions basique (K_2CO_3) en présence de CH_3OD comme donneur de deutérium.

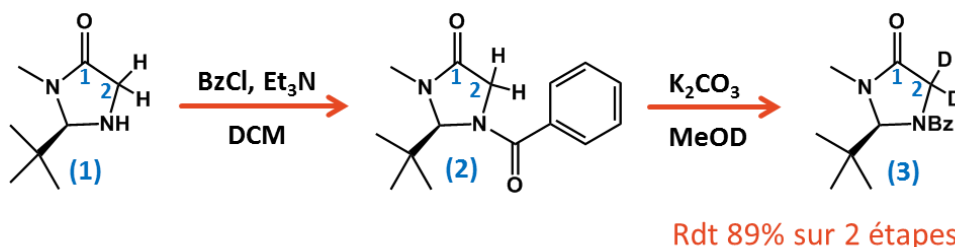


Figure V.22 : Etapes 1 et 2 (benzoylation et deutération) de la synthèse de la thréonine $^{13}CH_3$.

Étonnamment, l'acylation dans les conditions rapportées dans la littérature ($-100\text{ }^\circ\text{C}$, 5 min) n'a pas permis d'obtenir le produit désiré avec un rendement suffisant. Toutefois, la réalisation de la réaction à une température plus élevée ($-78\text{ }^\circ\text{C}$) et pendant une plus longue période (45 min) permet d'obtenir un meilleur rendement sans affecter la stéréosélectivité de la réaction puisqu'un seul isomère (**4**) a pu être observé.

Ensuite, l'introduction du deutérium en position 3 a pu être réalisée stéréosélectivement en utilisant $NaBD_4$ dans du méthanol. Dans ces conditions, il avait été rapporté une migration quantitative du groupement benzoyle de l'amine vers l'hydroxyle formé lors de la réduction du carbonyle. Dans notre cas, un mélange d'isomère (**5,5'**) a été obtenu dans des proportions 1:2 respectivement.

Par ailleurs, et de manière plus problématique, la formation d'une quantité non négligeable de produit protoné en C-2 résultant d'un échange du deutérium par un proton issu du méthanol a été observé (Figure V.23), le réducteur agissant probablement comme une base.

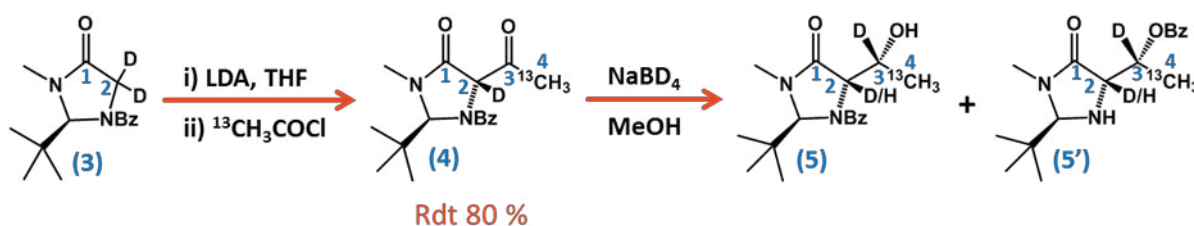


Figure V.23 : Etapes 3 et 4 (acylation et réduction) de la synthèse de la thréonine $^{13}CH_3$.

Ce problème aurait pu être résolu en utilisant du méthanol deutéré CH_3OD au lieu du méthanol protoné. Malheureusement, cela a induit un déplacement du problème sur la position 4 énolisable avant réduction entraînant l'apparition d'un mélange d'isotopomères ($^{13}\text{CH}_3$, $^{13}\text{CHD}_2$, $^{13}\text{CH}_2\text{D}$, $^{13}\text{CD}_3$) hautement préjudiciable et non séparables (Figure V.24).

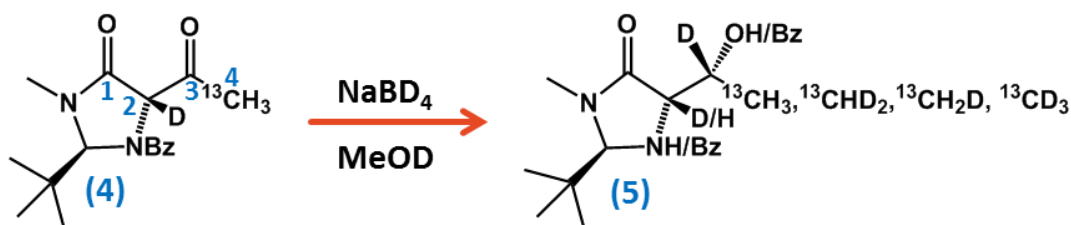


Figure V.24 : Formation des isotopomères induits par la réalisation de la réduction en milieu deutéré.

Heureusement, l'équipe de J. Boisbouvier a pu montrer qu'un échange H/D en position 2 pouvait être réalisé enzymatiquement avec une rétention totale de la configuration en présence de D_2O .¹⁸⁵ Par conséquent, il a été décidé de revenir aux conditions initiales (NaBD_4 , MeOH) et de poursuivre avec le mélange d'isotopomères en C-2.

Après 72h en présence d' HCl concentré à 100°C , la *L*-thréonine a finalement pu être obtenue en présence de 7% d'allothréonine, indiquant que l'étape de réduction n'est pas aussi stéréosélective qu'indiquée. Cette dernière a pu être éliminée par chromatographie sur colonne de silice. L'échange H/D a ensuite été réalisé efficacement grâce à la BCAT (branched-chain amino acid transaminase) (Figure V.25).

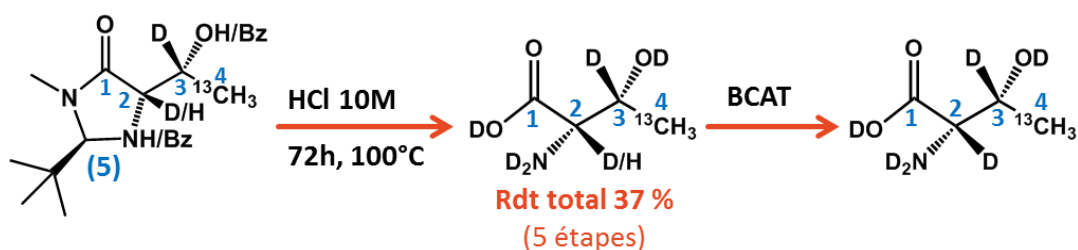


Figure V.25 : Dernières étapes (hydrolyse et échange enzymatique H/D) de la synthèse de la thréonine.

La configuration absolue a pu être confirmée grâce au dichroïsme circulaire par comparaison avec la *L*-thréonine commerciale (Figure V.26).

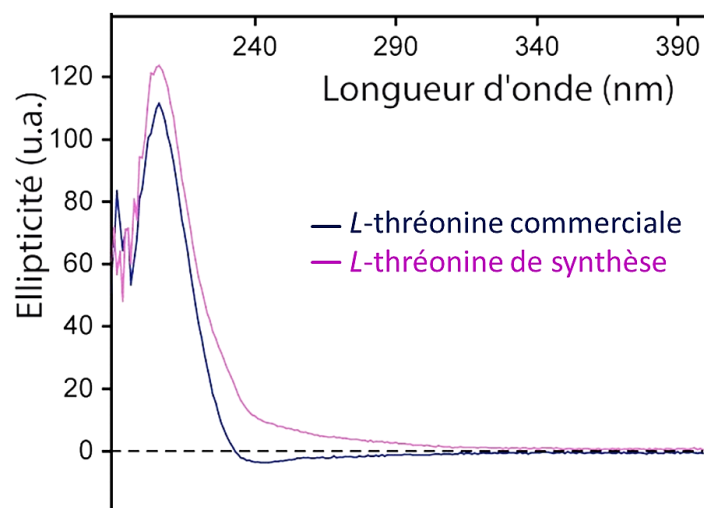


Figure V.26 : Comparatifs des spectres de dichroïsme circulaire de la L-Thréonine commerciale et de la L-thréonine $^{13}\text{CH}_3$ de synthèse.

3. Synthèse stéréosélective de l'alanine sélectivement marquée $^{13}\text{CHD}_2$ (Mission II)

L'alanine est classiquement marquée en utilisant la voie métabolique d'*E coli* via du pyruvate marqué (Figure V.1, bleu). Cependant, le pyruvate permettant d'introduire le marquage $^{13}\text{CHD}_2$ n'est pas disponible commercialement.

Il nous a semblé possible d'adapter la synthèse précédente de la thréonine $^{13}\text{CH}_3$ à celle de l'alanine $^{13}\text{CHD}_2$ (Figure V.27).¹⁸⁷ En effet, les deux premières étapes (benzoylation et échange H/D en C-2) sont communes aux deux composés. Il suffisait de remplacer l'étape d'acylation par une étape d'alkylation en utilisant le $^{13}\text{CHD}_2\text{I}$ au lieu du chlorure d'acétyle.

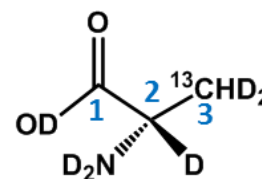


Figure V.27 : L-alanine deutérée marquée $^{13}\text{CHD}_2$.

L'étape d'alkylation a donc été réalisée dans des conditions proches de celles déterminées pour l'acylation (LDA, THF, -78°C puis $^{13}\text{CHD}_2\text{I}$). Cependant, à notre grande surprise, cela a conduit à un mélange de composés. D'une part, cette étape ne fut pas aussi stéréosélective que lors de l'acylation puisque 10 % de l'autre diastéréomère a été formé (Figure V.28, composé (6, 6')). De plus, une quantité non négligeable (10 %) de l'espèce protonée en C-2 a également été observée. Alors que la seule source de protons provenait de la solution aqueuse

de NH_4Cl utilisée pour neutraliser le milieu, son remplacement par une solution deutérée aurait dû permettre de diminuer le taux de protonation. Malheureusement, ce n'a pas été le cas. Actuellement, la source de proton n'a toujours pas été identifiée.

Par ailleurs, cette étape n'a malheureusement jamais pu être totale et ceci malgré de nombreux tests (température, quantité de réactifs, temps de réaction). C'est pourquoi, une étape de purification sur colonne chromatographique a été nécessaire, permettant d'une part d'isoler les isomères **(6)** et **(6')** tout en récupérant le produit de départ **(3)**.

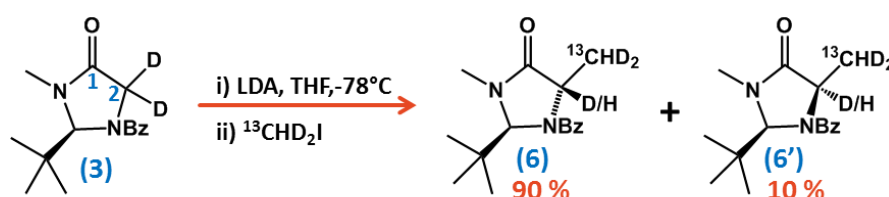


Figure V.28 : Etape d'alkylation de la synthèse de l'alanine deutérée $^{13}\text{CHD}_2$.

Après une hydrolyse acide de 48 h, l'alanine marqué $^{13}\text{CHD}_2$ a finalement été obtenu avec un rendement total de 60 % mais en présence de 10 % de *D*-alanine (Figure V.29). Heureusement cette dernière n'est pas incorporée dans les voies métaboliques d'*E.coli*.

La deutération des 10 % de protons présents en position 2 a été réalisée par voie enzymatique avec la BCAT de la même manière que pour la thréonine.

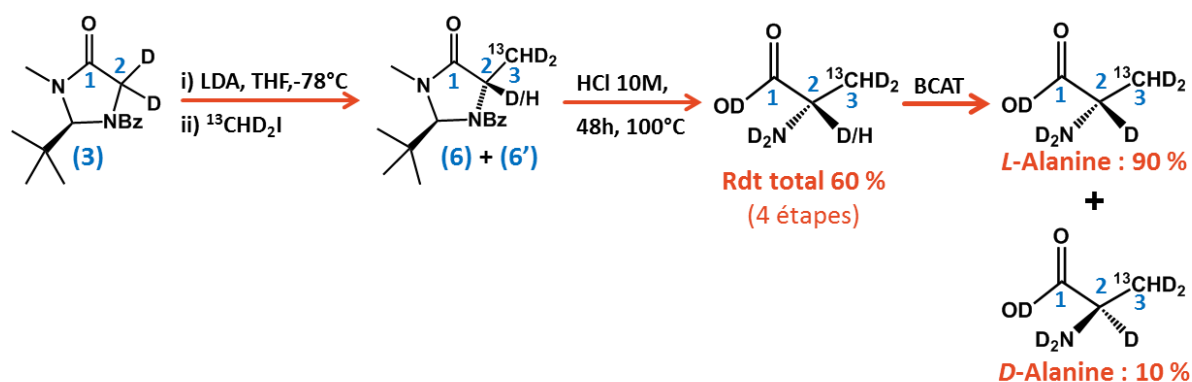


Figure V.29 : Synthèse développée pour la synthèse de l'alanine deutérée $^{13}\text{CHD}_2$.

Seebach¹⁸⁹ avait décrit la synthèse de l'inducteur de chiralité que nous avons utilisé aussi bien pour la synthèse de la thréonine que pour celle de l'alanine. Par conséquent, il est ainsi possible d'imaginer que l'introduction de ^{13}C sur la copule puisse permettre d'accéder à de nombreux dérivés marqués de ces deux acides aminés.

III. Conclusion

Le travail réalisés aux cours de mon doctorat-conseil a permis d'une part d'enrichir le catalogue de composés marqués proposés par NMR-Bio en développant de nouvelles voies de synthèse adaptables à de nombreux dérivés marqués de l'acétolactate, de la thréonine et de l'alanine. Et d'autre part, ces résultats ont permis d'accéder à de nouveaux types de marquage des protéines pour les études RMN. Il est maintenant possible de réaliser le marquage isolé (Figure V.30) ou combinatoire (Figure V.31) de chaque acides aminés méthylés grâce aux kits NMR-Bio.

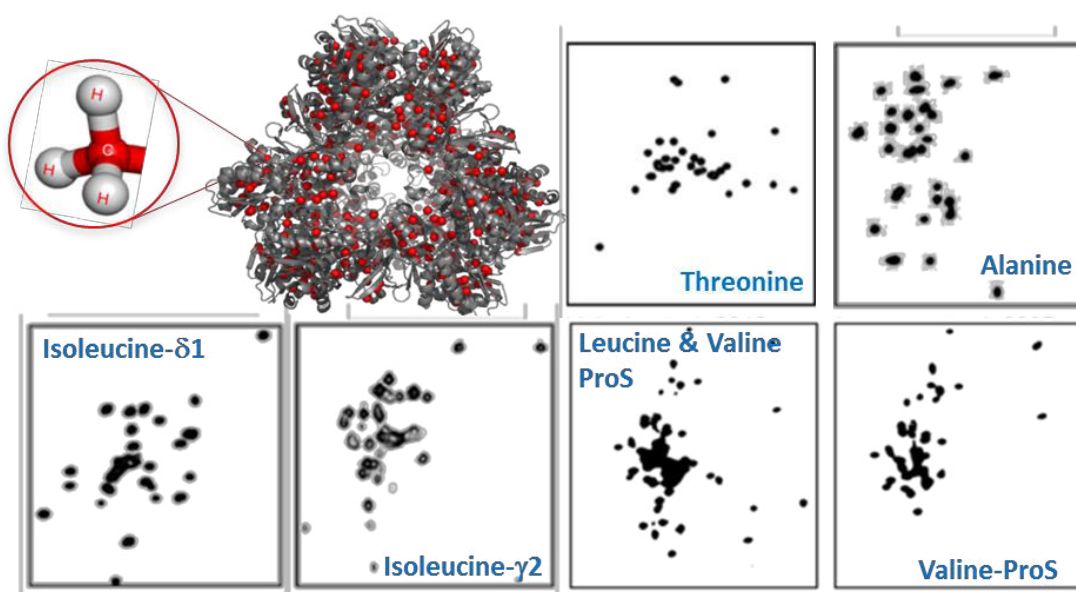


Figure V.30 : Les spectres RMN 2D représentant chaque type de groupement méthyle dans une protéine de 500 kDa.

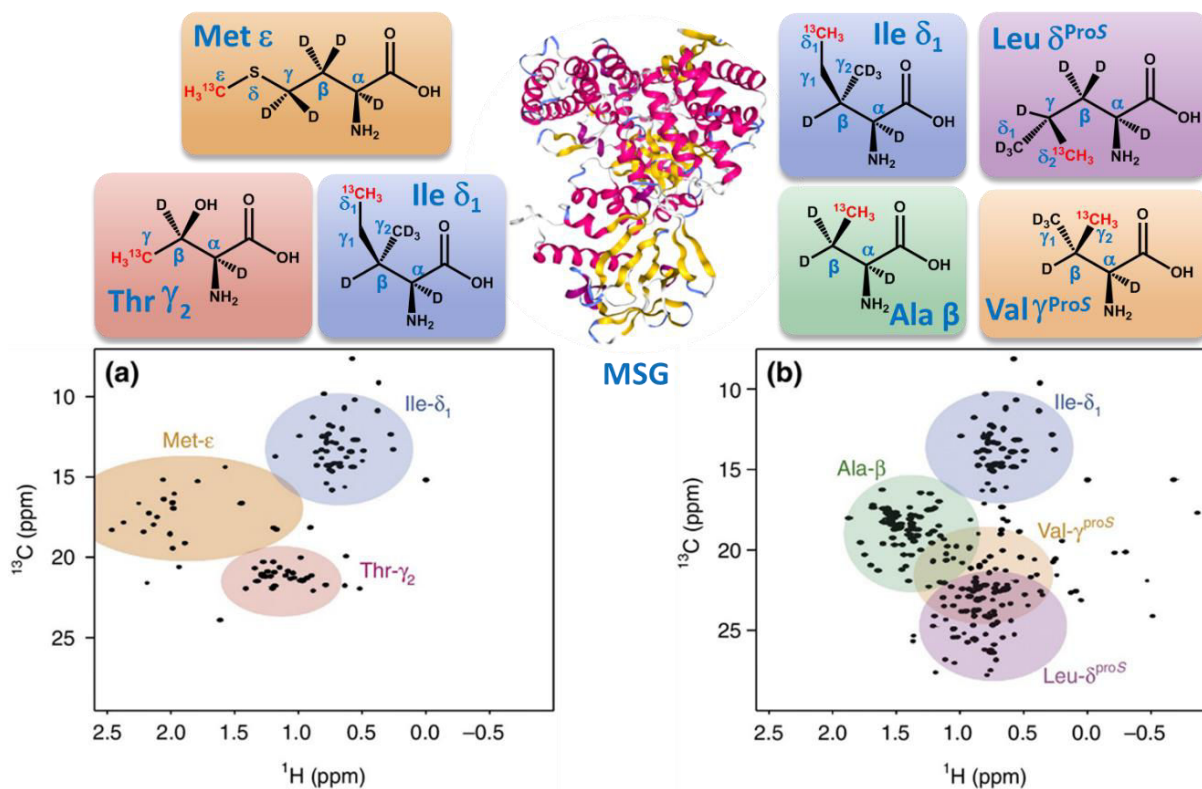


Figure V.31 : Exemples de Spectres RMN Méthyl-Trosy obtenus sur la protéine MSG (1D8C) après marquage isotopique combinatoire sur les groupements méthyles. (a) deutération complète et marquage $^{13}\text{CH}_3$ sur Ile- δ_1 , Met- ϵ , Thr- γ_2 ou (b) deutération complète et marquage $^{13}\text{CH}_3$ sur Ala- β , Ile- δ_1 , Leu/Val proS. Inspirée de la réf¹⁷³

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie expérimentale

I. 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 mentionnés.

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, q = quadruplet, m = multiplet.

Les spectres de masse des composés chimiques ont été enregistrés au SyMMES-CEA-Grenoble sur un appareil Thermoquest Finnigan LCQ à trappe d'ions utilisant la technique d'ionisation par électrospray (ESI-MS) en modes positif.

Les structures des DRX des protéines présentées ont toutes été réalisées avec le logiciel PyMOL.

Les spectres de masse des protéines ont été enregistrés à EdyP/BGE-CEA-Grenoble avec une nano-LC-MS/MS (NCS3500 UHPLC and QExactive HF, Thermo Fisher Scientific). Les données sont traitées à l'aide du logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Concernant les expériences MS/MS, le logiciel Mascot Distiller (version 2.5.1, Matrix Science) est utilisé puis les peptides sont identifiés par le logiciel Mascot (version 2.6)

Les spectres UV-visible des complexes de ruthénium en solution ont été réalisés sur un appareil Shimadzu UV-1800 dans des cuves ayant 1 cm de trajet optique.

Les données de spectroscopie optique des hybrides ont été obtenues sur le microspectrophotomètre du laboratoire icOS de l'ESRF.^{190,191}

Les spectres UV-visible des hybrides ont été obtenus avec un spectrophotomètre Ocean Optics QE65 Pro et une source de lumière blanche UV-Visible Ocean optics DH200Ba.

Les spectres Raman à résonance des hybrides ont été obtenus avec un spectromètre Raman Renishaw InVia avec une excitation laser à 785 nm (laser à diode RL785, 50 mW sur l'échantillon). L'échantillon est maintenu à 100 K à l'aide d'un système de refroidissement cryogénique par azote gazeux Oxford cryostream 700.

Les études par spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) ont été réalisées sur un appareil Shimadzu ICP 9000.

Les études par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) ont été réalisées sur un appareil Thermo Fisher Scientific iCAP RQ quadrupole mass instrument et les données sont traitées en utilisant le logiciel Qtegra fourni par Thermo Fisher Scientific.

Les références utilisées pour calibrer les spectromètres ont été achetées chez sigma-Aldrich. Le standard ruthénium est une solution de RuCl_3 à 1000 mg/L dans l'acide chlorhydrique 3% et le standard sélénium est une solution à 1000 mg/L dans l'acide nitrique à 2%.

Les analyses chromatographiques en phase liquide (HPLC) des sulfoxydes ont été effectuées sur un appareil Hewlett Packard 1100 instrument avec un détecteur UV-Visible à barrettes de diodes utilisant une colonne Whelk O2 (25 cm x 0,46 cm) et comme éluant un mélange hexane:isopropanol 90:10 avec un débit de 2 mL/min.

II. Leafy N-ter

A. Production et purification¹²⁸

Expression et production des protéines Leafy-Nter

Les plasmides de LFY-Nter (*pETH195* pour WT ou *pETH271* pour K84C)¹²⁸ ont été incorporés par choc thermique dans des bactéries compétentes *E. coli* souche Rosetta 2 (DE3). Après sélection sur boîte LB-Agar (Kanamycin (50 mg/mL) et Chloramphénicol (34 mg/mL)), plusieurs colonies sont transférées dans 5 mL de préculture (milieu LB (20 g/L), Kanamycin (50 mg/mL) et Chloramphénicol (34 mg/mL), puis laissée à 37 °C, sous agitation pour 2h. La préculture est utilisée pour inoculer 1 L de milieu LB (20 g/L) contenant 50 mg/mL de Kanamycin et 34 mg/mL de Chloramphénicol. La culture est laissée à 37 °C et sous agitation (120 tr/min) jusqu'à l'obtention d'une densité optique comprise entre 0,6 et 0,8 à 600 nm, puis transférée à 17 °C pendant 1 h avant induction à l'IPTG (0,4 mM). Après une nuit de croissance à 17 °C, les cellules sont centrifugées (4000 tr/min, 40 min, 4°C) et lavées avec 20 mL de tampon Tris-HCl 20 mM pH 8. Le culot obtenu après centrifugation (4000 tr/min, 30 min, 4 °C) est congelé à -80 °C pour la nuit.

Purification des protéines Leafy-Nter

Le culot bactérien est resuspendu dans 40 mL de tampon de lyse (Tris-HCl 20 mM pH8, TCEP 1 mM, 1 pastille d'inhibiteur de protéase Complete EDTA free) puis soniqué (60 % pendant 15 min (60 % amplitude, pulse 1s, intervalle 2s). Après centrifugation (12000 tr/min, 30 min, 4 °C), le surnageant est transféré sur une colonne contenant 1,5 mL de résine Ni-Sepharose High Performance préalablement équilibrée avec 20 mL de tampon Tris-HCl 20mM pH8, TCEP 1 mM. Un lavage est ensuite réalisé avec 20 mL de tampon Tris-HCl 20 mM pH8, TCEP 1 mM, 20 mM d'imidazole avant élution en fraction de 2,5 mL par un tampon Tris-HCl 20 mM pH8, TCEP 1 mM, 300 mM d'imidazole. Les fractions éluées sont immédiatement diluées deux fois dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH8, TCEP 1 mM et dialysées (1 L de Tris-HCl 20 mM pH8, TCEP 1 mM) pendant une nuit. Après dialyse, la protéase TEV-His-Tag (9 % w/w) est ajoutée et laissée à 4°C et sous agitation pour une nuit afin de réaliser la coupure de l'His-tag de LFY-Nter. La solution est ensuite chargée sur une résine Ni-Sepharose High Performance afin d'enlever l'His-tag coupé, la protéine LFY-Nter non clivée et la protéase TEV-His-tag. La protéine LFY-Nter clivée n'est pas retenue sur la colonne, et se retrouve dans le « flow through » et les lavages. Les fractions contenant la protéine sont réunies puis purifiées par chromatographie

d'exclusion stérique sur une colonne Superdex-200 16/60 Prep Grade Superdex-200 (GE Healthcare) équilibrée avec un tampon Tris-HCl 20 mM pH8, TCEP 1 mM (0,5 mL/min). Après la concentration à l'aide de filtres Ultra Centrifugal Amicon (Millipore), la concentration en protéines est évaluée à l'aide d'un NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) en utilisant le coefficient d'extinction calculé (Protparam, Expasy) pour Leafy K84C $\epsilon_{280} = 5960 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $M = 12788.73 \text{ Da}$ et Leafy WT $\epsilon_{280} = 5960 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $M = 12813.76 \text{ Da}$). Les rendements d'expression sont généralement de 30 à 70 mg/L de culture. Après avoir été aliquotées en fraction de 20 et 50 μL , les protéines sont congelées dans l'azote liquide et entreposées à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Expression et production des protéines Leafy-Nter sélénées par incorporation de sélénométhionines

Les plasmides de Leafy-Nter (*pETH195* ou *pETH271*) ont été incorporés par choc thermique dans des bactéries compétentes *E. coli* souche B834-pLys (DE3) auxotrophe méthionine. Après sélection sur boîte LB-Agar (Kanamycin (50 mg/mL) et Chloramphénicol (34 mg/mL)), plusieurs colonies sont transférées dans 5 mL de préculture (milieu LB (20 g/L), Kanamycin (50 mg/mL) et Chloramphénicol (34 mg/mL)), puis laissée à $37 \text{ }^\circ\text{C}$, sous agitation pour 2h. La préculture est utilisée pour inoculer 1 L de milieu LB (20 g/L) contenant 50 mg/mL de Kanamycine et 34 mg/mL de Chloramphénicol. La culture est laissée à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ et sous agitation (120 tr/min) jusqu' à l'obtention d'une densité optique de l'ordre de 0,3 à 600 nm. Les cellules sont alors centrifugées puis lavées avec du milieu minimum M9 (2 g/L NH_4Cl , 6 g/L KH_2PO_4 , 13,6 g Na_2HPO_4 anhydre).

La croissance est poursuivie dans 1 L milieu de culture minimum M9 (2 g/L NH_4Cl , 6 g/L KH_2PO_4 , 13,6 g/L Na_2HPO_4 anhydre), MgSO_4 (2 mM), FeSO_4 (12,5 mg/mL), glucose (0,4 g/mL), vitamines (thiamine, pyridoxine, riboflavine et niacinamide à 1 mg/mL), un mélange de tous les acides aminés, sauf la méthionine (895 mg/L) et antibiotiques (34 mg/mL de Chloramphenicol et 50 mg/mL de Kanamycine) à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ et sous agitation (120 tr/min) jusqu' à une densité optique de 0,5 à 600 nm. La sélénométhionine (4 mg/mL) est ajoutée et les cellules sont transférées à $17 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 1h avant d'induire à l'IPTG (0,4 mM). Après une nuit de croissance à $17 \text{ }^\circ\text{C}$, les cellules sont centrifugées (4000 tr/min, 40 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) et lavées avec 20 mL de tampon Tris-HCl 20 mM pH8. Le culot obtenu après centrifugation (4000 tr/min, 30 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) est congelé à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ pour la nuit.

La purification est identique à celle de la protéine non sélénée. Les rendements d'expression sont plus faibles de 0,54 mg/L de culture pour Leafy WT et 1,6 mg/L pour Leafy K84C. Après avoir été aliquotées en fraction de 30 μ L, les protéines sont congelées dans l'azote liquide et stockées à -80 °C.

B. Cristallisation

Leafy-Nter a été cristallisée par la méthode de diffusion de vapeur en goutte suspendue dans des plaques EasyXtal 15-Well Tools. Les gouttes suspendues sont préparées en mélangeant 2 μ L d'une solution de Leafy à 2,5 mg/mL avec 2 μ L de tampon de cristallisation, déposées sur une lamelle siliconée. La lamelle est ensuite retournée et vissée sur un puits contenant 500 μ L de solution de tampon de cristallisation. Les boîtes sont ensuite placées à 20 °C.

Protéine	Tampon de cristallisation
Leafy K84C	12,5 mM Tris-HCl pH7,2; 550 mM Sulfate d'ammonium ; 1 mM TCEP
Leafy WT	25 mM Tris-HCl pH7,2; 320 mM Sulfate d'ammonium
Leafy K84C sélénée	12,5 mM Tris-HCl pH7,2; 300 mM Sulfate d'ammonium ; 2 mM TCEP
Leafy WT sélénée	12,5 mM Tris-HCl pH7,2; 500 mM Sulfate d'ammonium ; 2 mM TCEP

C. Quantification de la protéine in crystallo par gel d'électrophorèse.

Gamme d'étalonnage

Une solution mère de **Leafy WT** est préparée à partir de 20 μ L d'une solution de protéine à 4,17 mg/mL dont la concentration précise a été préalablement établie avec la technique du SEC-MALLS auxquels sont ajoutés 323 μ L de tampon Tris-HCl pH 7,2 10mM et 323 μ L de bleu de dénaturation (10 mL Tris-HCl pH6,8, 6 mL de solution 40% SDS, 60 mL Glycérol, 24 mL eau) pour une concentration finale de 0,125 mg/mL. La solution est laissée dénaturer à 90°C pendant 15 min.

La gamme est ensuite réalisée entre 0 à 1,5 μ g de **Leafy WT** par ajout dans chacun des puits de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 μ L de la solution mère **Leafy WT** dénaturée.

Préparation des échantillons de cristaux

Chaque échantillon contient les cristaux issus d'une goutte de cristallisation. Après avoir été pêchés dans un eppendorf, chaque échantillon est rincé plusieurs fois à l'eau. Puis 10 μL de bleu de dénaturation sont ensuite ajoutés et les échantillons sont laissés dénaturer à 90 °C pendant 15 min. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel.

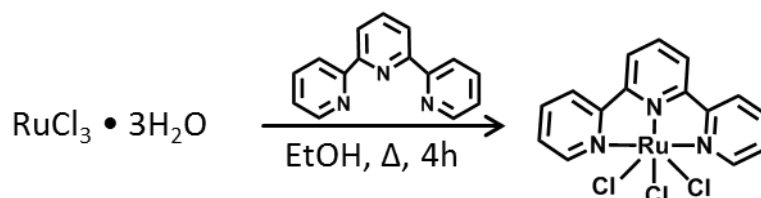
Analyse des résultats

Après migration du gel, ce dernier est photographié sur un appareil GelDoc-EZ imager Biorad. Le logiciel de traitement d'image intégré (ImageLab), corrèle l'intensité de chaque bande de la gamme d'étalonnage afin de réaliser une droite d'étalonnage utilisée pour donner la quantité de protéines présente dans chaque échantillons de cristaux.

III. Synthèse des complexes de Ruthénium

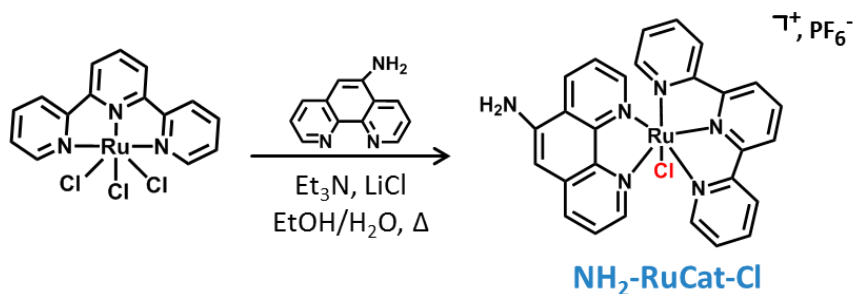
A. Synthèse IA-RuCat-Cl

Synthèse du complexe $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{terpy})\text{Cl}_3]^{138}$



A une solution de $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (509,2 mg, 1,9 mmol, 1,3 eq) dans l'éthanol absolue (200 mL) est ajoutée la terpyridine (350,72 mg, 1,5 mmol, 1,0 eq). Le mélange est porté à reflux et l'avancement de la réaction est suivi par ccm sur gel de silice (95 : 5, acétone:solution aqueuse de KNO_3 à 3 %). Après 3h, le mélange est laissé revenir à température ambiante, avant d'être filtré. Le solide est alors lavé à l'éthanol (3x60 mL) puis à l'éther diéthylique (3x60 mL) donnant le produit sous forme d'une poudre marron (650,7 mg, 94 %).

Synthèse du complexe [Ru^{II}(terpy)(aminophen)Cl][PF₆] (NH₂-RuCat-Cl)



A une solution de Ru^{III}(terpy)Cl₃ (549,3 mg, 1,2 mmol, 1,0 eq) dans un mélange éthanol-eau (75 : 25 mL) sont ajoutés la 5-amino-1,10-phenanthroline (235,3 mg, 1,2 mmol, 1,0 eq), la triéthylamine (243 μL, 1,8 mmol, 1,5 eq) et le chlorure de lithium (287,1 mg, 6,8 mmol, 5,5 eq). Le mélange est porté à reflux et l'avancement de la réaction est suivi par ccm sur gel de silice (95 : 5 acétone-solution aqueuse de KNO₃ à 3 %). Après 3 h, la solution est refroidie à température ambiante. La solution est concentrée au 5ème sous pression réduite, puis un excès de KPF₆ est ajouté pour précipiter le complexe. Le solide obtenu est filtré, puis lavé successivement avec de l'eau et de l'éther diéthylique. Le composé est ensuite purifié sur colonne de gel de silice (éluant 95 : 5 acétone-solution aqueuse de KNO₃ à 3 %). La métathèse de l'anion est ensuite réalisée après évaporation des solvants, dissolution dans un minimum d'eau et addition d'un excès de KPF₆. Après filtration, lavage à l'eau et séchage à l'éther diéthylique, le complexe est obtenu sous la forme d'une poudre rouge foncée (674 mg, 79 %) composée de deux régioisomères (proportion ≈61:39).

RMN ¹H (300 MHz, acétone-d₆) : Mélange de 2 isomères δ 10,56 (d, *J* = 5,2 Hz, 0,61H phen), 10,18 (d, *J* = 6,3 Hz, 0,38H phen), 9,14 (d, *J* = 8,3 Hz, 0,61H phen), 8,77 (d, *J* = 7,9 Hz, 2,01H terpy), 8,62 (d, *J* = 8,1 Hz, 2,04H terpy), 8,55 (d, *J* = 8,2 Hz, 0,75H phen), 8,41 (m, 0,61H phen), 8,23 (m, 1,41H (1,05H terpy+0,35H phen)), 7,96 (m, 2,56H (1,92H terpy + 0,64H phen)), 7,90 (d, *J* = 5,5 Hz, 0,39H phen), 7,72 (m, 2,03H terpy), 7,48 (d, 5,2 Hz, 0,60H phen), 7,42 (m, 0,29H phen), 7,40 (s, 0,49H phen), 7,3 (m, 2,07H terpy), 7,20 (m, 0,61H phen), 7,16 (s, 0,57H phen), 6,41 (s, 1,2H NH₂), 6,16 (s, 0,76H NH₂).

RMN ¹³C (75 MHz, acétone-d₆) : Mélange de 2 isomères δ 159,0; 158,9; 158,4; 158,4; 152,9; 152,4; 152,4; 152,3; 148,4; 148,1; 147,4; 144,9; 136,7; 133,3; 132,9; 132,6; 132,4; 132,3;

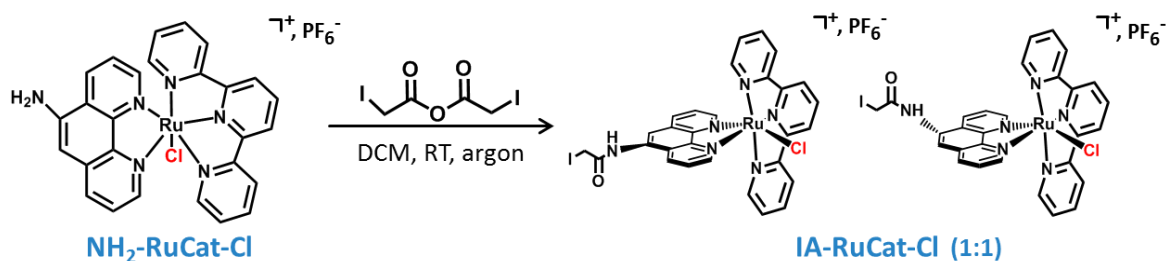
131,3; 130,1; 129,1; 127,1; 127,1; 125,5; 124,7; 124,5; 123,8; 123,6; 123,4; 123,3; 123,3; 122,3; 122,2; 103,2; 102,4.

ESI-MS (m/z) (intensité relative) : 565,0 [NH₂-RuCat]⁺ (100)

UV-vis (acétone, λ (nm), ε (M⁻¹.cm⁻¹) : 510 (10629), 422 (6451), 362 (9942)

HRMS (ESI+) : calculé C₂₇H₂₀ClN₆Ru 565,0476; trouvé 565,0472

Synthèse du complexe [Ru^{II}(terpy)(IA-phen)Cl][PF₆]



A une solution de complexe [Ru^{II}(terpy)(aminophen)Cl][PF₆] (369,2 mg, 0,5 mmol, 1,0 eq) dans du dichlorométhane anhydre (30 mL) est ajouté l'anhydride iodoacétique (229,5 mg, 0,60 mmol, 1,2 eq) sous atmosphère inerte. L'agitation est ensuite maintenue pendant 16 h. Un lavage avec une solution de bicarbonate de sodium 5 % est réalisé. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na₂SO₄, concentrées au 5ème sous pression réduite avant l'ajout d'un grand volume d'éther diéthylique conduisant à la précipitation du complexe. Le solide obtenu est ensuite purifié sur colonne de gel de silice (éluant 95 : 5, acétone : solution aqueuse de KNO₃ à 3 %). Après évaporation des solvants, la métathèse de l'anion est réalisée en solubilisant le solide dans un minimum d'eau et en ajoutant un excès de KPF₆. Le précipité est lavé à l'eau puis à l'éther diéthylique. Le complexe est obtenu sous la forme d'une poudre rouge foncée (236,4 mg, 62 %) composée de deux régioisomères (1 : 1).

RMN ¹H (300MHz, acetone-d₆): Mélange de 2 Isomères δ 10,51 (dd, J = 5,2 Hz, 1,0 Hz, 1H phen), 10,40 (dd, J = 5,2 Hz, 1,2 Hz, 1H phen), 10,09 (s, 1H NH), 9,85 (s, 1H NH), 9,06 (dd, J = 8,6 Hz, 1,1 Hz, 1H phen), 8,85 (dd, J = 8,2 Hz, 1,0 Hz, 1H phen), 8,67 (dd, J = 8,1 Hz, 1,8 Hz, 4H terpy), 8,63 (s, 1H phen), 8,52 (d, J = 8,3 Hz, 4H terpy), 8,49 (s, 1H phen), 8,45 (dd, J = 8,5 Hz, 1,1 Hz, 1H phen), 8,42-8,30 (m, 2H phen), 8,27 (dd, J = 8,2 Hz, 1,1 Hz, 1H phen), 8,14 (dt, J =

8,1 Hz, 3,1 Hz, 2H terpy), 7,90 (dd, $J = 5,3$ Hz, 1,0 Hz, 1H phen), 7,85 (dt, $J = 7,9$ Hz, 1,5 Hz, 4H terpy), 7,78 (dd, $J = 5,3$ Hz, 1,1 Hz, 1H phen), 7,61 (t, $J = 5,4$ Hz, 4H terpy), 7,42-7,30 (m, 2H phen), 7,19- 7,11 (m, 4H terpy), 4,16 (s, 2H CH₂l), 4,03 (s, 2H CH₂l).

RMN ¹³C (75 MHz, acétone-d₆) : Mélange de 2 Isomères δ 153,5; 152,8; 152,6; 152,5; 151,8; 149,6; 136,9; 135,1; 133,9; 133,7; 133,6; 133,1; 130,4; 130,1; 129,3; 127,10; 127,1; 126,4; 126,3; 126,1; 126,0; 125,4; 125,4; 125,3; 125,2; 124,6; 124,5; 123,4; 122,9; -0,9; -1,1.

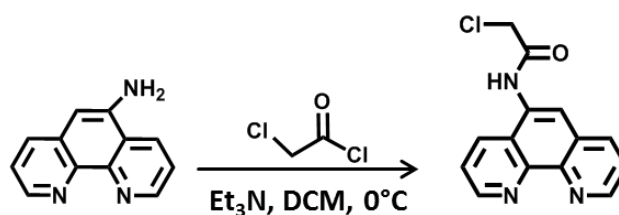
ESI-MS (m/z) (intensité relative) : 733,1 [IA-RuCat-Cl]⁺ (100), 825,0 [IA-RuCat-I]⁺ (10)

UV-vis (acétone, λ (nm), ϵ (M⁻¹.cm⁻¹) : 508 (10801), 443 (6843)

HRMS (ESI+) : calculé C₂₉H₂₁ClN₆ORu 732,9548; trouvé 732,9544.

B. Synthèse du CIA-RuCat-Cl

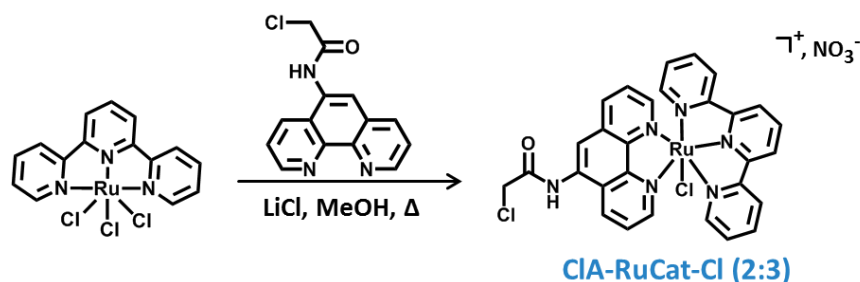
Synthèse de la 5-Chloroacetamido-1,10-phenanthroline (CIA-phen)¹⁴²



A une solution de 5-amino-1,10-phenanthroline (500 mg, 2,6 mmol, 1,0 eq) dans du dichlorométhane (50 mL) à 0 °C est ajoutée la triéthylamine (3 mL, 21,5 mmol, 8,4 eq) puis goutte à goutte le chlorure d'acétyle (825 μ L, 11,6 mmol, 4,5 eq). La solution est laissée revenir lentement à température ambiante puis agitée pendant trente minutes supplémentaires. Le mélange réactionnel est ensuite lavé à l'eau (4x30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous pression réduite. Le solide marron ainsi obtenu est recristallisé dans du méthanol, filtré puis rincé avec de l'acétone et du dichlorométhane donnant 49 mg de composé avec un rendement de 7 %. Les données spectroscopiques RMN ¹H sont conformes à celles données dans la littérature.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,12 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 8,93 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 8,68 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,10 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,66 (m, 1H), 7,55 (m, 1H), 5,55 (s, 1H NH), 6,40 (s, 2H CH₂Cl).

Synthèse du complexe [Ru^{II}(terpy)(ClA-phen)Cl][NO₃]



A une solution de Ru^{III}(terpy)Cl₃ (79,5 mg, 180,5 μmol, 1,0 eq) dans du méthanol (15 mL) sont ajoutés la phénanthroline-CIA (49,0 mg, 180,5 μmol, 1,0 eq) et le chlorure de lithium (76,7 mg, 1,8 mmol, 10,0 eq). Le mélange est porté à reflux et l'avancement de la réaction est suivi par ccm (70 : 30, acétone : solution aqueuse de KNO₃ à 3 %). Après 7 h, la solution est laissée revenir à température ambiante, puis filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est redissous dans l'eau puis un excès de KPF₆ est ajouté afin de précipiter le complexe. Le solide obtenu est filtré, puis lavé successivement avec de l'eau et de l'éther diéthylique. Le composé est ensuite purifié sur colonne de gel de silice (éluant 80 : 20, acétone : solution aqueuse de KNO₃ à 3 %). Le complexe est obtenu sous la forme d'une poudre rouge foncée (16 mg, 13 %) composée de deux régioisomères (proportion ≈ 64:36).

RMN ¹H (300 MHz, CD₂Cl₂) : Mélange de 2 Isomères δ 10,77 (s, 0,36H, NH), 10,66 (s, 0,64H NH), 10,57 (d, *J* = 4,4 Hz, 0,36H phen), 10,49 (dd, *J* = 5,2 Hz, 1,2 Hz, 0,64H phen), 9,23 (d, *J* = 7,6 Hz, 0,36H phen), 8,75 (s, 0,86H phen), 8,73-8,62 (m, 2,12H phen), 8,52 (s, 0,46H phen), 8,85 (dd, *J* = 8,2 Hz, 1,0 Hz, 1H phen), 8,40 (d, *J* = 8,1 Hz, 2,48H terpy), 8,35-8,29 (m, 0,82H phen), 8,27 (d, *J* = 7,4 Hz, 2,63H terpy), 8,23 (ds, 0,35H phen), 7,85 (dt, *J* = 7,9 Hz, 2,7 Hz, 1,43H terpy), 8,04 (ds, 0,27H phen), 7,81 (dt, *J* = 7,8 Hz, 1,4 Hz, 2,39H terpy), 7,58 (ds, 0,42H phen), 7,55 (t, *J* = 5,9 Hz, 2,52H terpy), 7,49 (dd, *J* = 5,3 Hz, 0,7 Hz, 0,49H phen), 7,37-7,30 (m, 0,85H phen), 7,28-7,22 (m, 0,57H phen), 7,16 (t, 6,4 Hz, 2,27H terpy), 4,58 (s, 0,62H CH₂Cl), 4,48 (s, 1,38H CH₂Cl).

RMN ¹³C (75 MHz, CD₂Cl₂) Mélange de 2 Isomères δ 166,2; 166,1; 158,9; 158,8; 158,3; 153,4; 152,8; 152,7; 152,6; 152,6; 152,5; 151,8; 149,5; 145,5; 136,8; 135,1; 133,9; 133,6; 133,1; 130,4; 130,2; 130,1; 130,0; 127,10; 126,4; 126,3; 126,0; 125,3; 125,2; 124,4; 123,4; 122,4; 120,4; 119,9; 43,3; 43,1.

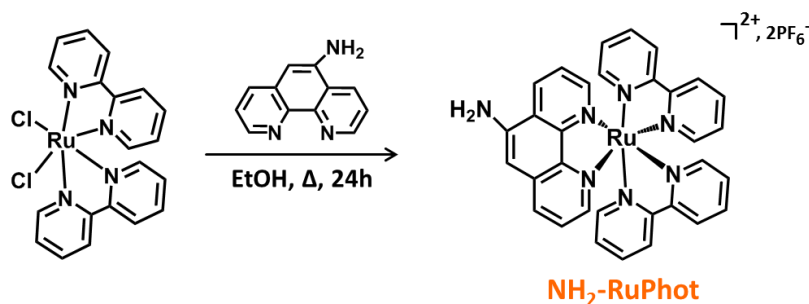
ESI-MS (m/z) (intensité relative) : 641,2 [CIA-RuCat-Cl]⁺ (100)

UV-vis (CD₂Cl₂, λ (nm), ε (M⁻¹.cm⁻¹) : 507 (5332,3), 440 (3770,6)

HRMS (ESI+) : calculé C₂₉H₂₁Cl₂N₆ORu 641,0192; trouvé 641,0187.

C. Synthèse du NH₂-RuPhot

Synthèse du complexe [Ru^{II}(bpy)₂(aminophen)][2PF₆]



La synthèse est réalisée selon le protocole publié par Qi et al.¹⁹²

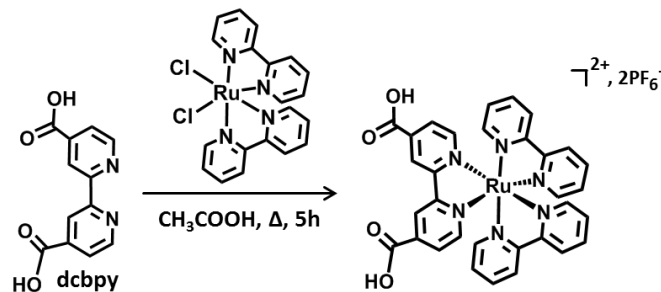
A une solution de *cis*-Ru^{II}(bpy)₂Cl₂ (330,1 mg, 0,6 mmol, 1,0 eq) dans un l'éthanol (100 mL) est ajouté la 5-amino-1,10-phenanthroline (128,8 mg, 0,6 mmol, 1,0 eq). Le mélange est porté à reflux pendant 24 h, puis laissé revenir à température ambiante avant d'être concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est dissous dans l'eau, puis un excès de KPF₆ est ajouté. Le mélange est laissé 12 h à 4 °C pour une précipitation maximale du complexe. Le solide obtenu est filtré, puis lavé successivement à l'eau glacée et à l'éther diéthylique, ainsi qu'avec du chloroforme. Le composé est obtenu sous la forme d'une poudre orange foncée (545 mg, 96 %).

Les données spectroscopiques (RMN ¹H) correspondent à celles trouvées dans la littérature.

RMN ¹H (300 MHz, acétone-d₆) δ 8,97 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 8,84 (t, *J* = 9,4 Hz, 4H), 8,41 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,26 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 8,17 (m, 4H), 7,97 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H), 7,90 (m, 3H), 7,64 (m, 3H), 7,44 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H), 7,31 (s, 1H), 6,40 (s, 2H NH₂).

D. Synthèse du NHS-RuPhot

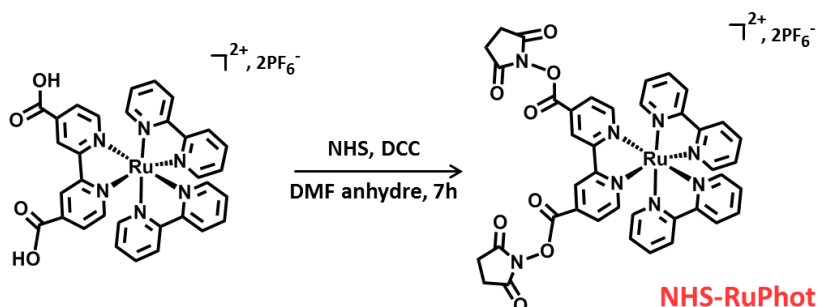
Synthèse du complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})][\text{PF}_6]$ (COOH-RuPhot)



La synthèse est réalisée selon le protocole publié par Beer et al.¹⁵⁵

Une solution de *cis*-Ru^{II}(bpy)₂Cl₂ (330,1 mg, 0,6 mmol, 1,0 eq) et d'acide 2,2'-bipyridinyl-4,4'-dicarboxylique (dcbpy) (128,8 mg, 0,6 mmol, 1,0 eq) dans de l'acide acétique 80 % (30 mL) est portée à reflux pendant 5 h sous agitation. Après retour à température ambiante, le mélange est concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu est redissous dans un minimum d'éthanol, acidifié avec du HCl concentré, puis filtré sur célite. Le filtrat est concentré sous pression réduite et après l'addition d'un excès d'éther diéthylique, le mélange est laissé sous agitation pendant plusieurs heures afin de faire précipiter le produit. Après filtration et séchage à l'éther diéthylique, la métathèse de l'anion est réalisée en solubilisant le composé dans un minimum d'eau auquel est additionné d'un excès de KPF₆. Après filtration, lavage à l'eau et séchage à l'éther diéthylique, le complexe est obtenu sous la forme d'une poudre rouge foncée (211 mg, rendement 70 %). Les données spectroscopiques correspondent à celles de la littérature.

RMN ¹H (300 MHz, acétone-d₆) δ 9,32 (s, 2H), 8,85 (d, *J* = 8,1 Hz, 4H), 8,35 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 8,29-8,21 (m, 4H), 8,11-8,06 (m, 4H), 8,06 (dd, *J* = 5,7 Hz, 1,5 Hz, 2H), 7,64-7,55 (m, 4H).

Synthèse du complexe $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_2(\text{NHS-dcbpy})][\text{PF}_6]^{-}$ (NHS-RuPhot).¹⁵⁶

A une solution de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (12,1 mg, 58,7 μmol , 5,8 eq) et de N-hydroxysuccinimide (NHS) (6,3 mg, 54,8 μmol , 5,4 eq) dans du DMF anhydre (3 mL) est ajouté, après 30 minutes d'agitation à 0 °C et sous atmosphère inerte le complexe **COOH-RuPhot** (10,0 mg, 10,2 μmol , 1,0 eq). Après 30 minutes à 0 °C, le mélange réactionnel est laissé remonter à température ambiante. Après 16 h, l'urée formée est éliminée par centrifugation, puis le mélange concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans un minimum d'acétone puis le produit précipité dans un grand volume d'éther diéthylique. Après filtration, le produit est obtenu sous forme d'un solide noir (8,0 mg, 67 %). En raison de l'instabilité du complexe, celui-ci n'est pas purifié et est conservé sous atmosphère inerte à -80 °C.

RMN ^1H (300 MHz, acétone- d_6) δ 9,60 (d, $J = 1,4$ Hz, 2H), 8,86 (q, $J = 8,0$ Hz, 5,3 Hz, 4H), 8,54 (d, $J = 5,9$ Hz, 2H), 8,26 (dq, $J = 7,8$ Hz, 1,4 Hz, 4H), 8,20 (d, $J = 5,6$ Hz, 4H), 8,20 (dd, $J = 5,6$ Hz, 1,8 Hz, 2H), 8,09 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H), 7,64 (dt, $J = 6,4$ Hz, 1,1 Hz, 4H), 7,53 (dt, $J = 6,4$ Hz, 1,1 Hz, 4H), 3,03 (s, 2H).

ESI-MS (m/z) (intensité relative) : 426,2 [**NHS-RuPhot**] $^{2+}$ (41), 377,5, [**COOH-RuPhot**] $^{2+}$ (76), 355,0 [$\text{Ru}(\text{bpy})_3$] $^{2+}$ (100).

IV. Hybrides Leafy-Ru

A. Procédure de greffage de IA-RuCat-Cl sur Leafy en solution

A 20 μL de protéine à 2,5 mg/mL (195,5 μM) est ajouté 1 μL de complexe IA-RuCat-Cl à 32 mM dans le DMSO (8 eq/monomère de protéine). Le mélange est laissé incuber une nuit à 4°C et dialysé (50 mL de Tris-HCl 20 mM pH8, TCEP 1 mM, 5 % DMSO) à 4°C pendant cinq jours en changeant le tampon 1 fois/jour. La solution est ensuite placée dans un tube Eppendorf de 500 μL et centrifugée (3500 tr/min, 5 s).

B. Procédure de greffage sur les cristaux de Leafy

1. Hybride IA-RuCat-Cl \subset Leafy K84C

Dans chaque goutte de cristallisation (4 μL) sont ajoutés 2 μL d'une solution de **IA-RuCat-Cl** à 0,8 mM dans l'acétone (14,2 eq/cystéine). Après une nuit d'incubation, cinq gouttes de cristallisation sont réunies dans un tube Eppendorf, puis centrifugées et lavées plusieurs fois avec de l'acétone et le tampon de cristallisation jusqu'à disparition complète des complexes de ruthénium non greffé.

2. Hybride NHS-RuPhot \subset Leafy

Cinq gouttes de cristallisation sont réunies dans un tube Eppendorf. Le tampon de cristallisation est remplacé par un tampon de greffage (pour **Leafy K84C** : Hepes-Na 20 mM pH 7,5, 1 mM TCEP, 550 mM sulfate d'ammonium, pour **Leafy WT** : Hepes-Na 20 mM pH 7,5, 320 mM sulfate d'ammonium) par cycle de lavage/centrifugation (3500 tr/min, 5 s) afin d'éliminer le Tris-HCl susceptible de réagir avec la fonction NHS du complexe. 2 μL d'une solution de **NHS-RuPhot** à 6 ou 12 mM dans un mélange DMF : eau (1:1) (14 eq ou 28 eq/lysine) sont ajoutés et laissés incuber pour une nuit. L'excès de complexe de ruthénium est ensuite éliminé par plusieurs cycles de lavage/centrifugation avec le mélange eau : DMF (1:1), puis du tampon de cristallisation.

3. Hybride IA-RuCat-Cl + NHS-RuPhot \subset Leafy K84C

Ce double hybride est réalisé en appliquant successivement les procédures décrites pour la formation de l'hybride **IA-RuCat \subset Leafy K84C** suivies de celles pour l'hybride **NHS-RuPhot \subset Leafy K84C**.

C. Méthodes de caractérisation

1. Spectrométrie de masse

Préparation des échantillons pour une digestion en gel (Bottom-up)

20 µl des solutions de **RuCat** et **Leafy K84C** et cristaux **RuCat** et **Leafy K84C** dissous dans une solution aqueuse à 5 % en acide formique ont été déposés sur un gel de page 1D SDS pour une «digestion en gel».

Les morceaux de gel correspondant à **RuCat** et **Leafy K84C** sont coupés et lavés manuellement en utilisant d'abord un mélange acétonitrile : bicarbonate d'ammonium 25 mM (1:1), puis une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM en solution aqueuse. Ils sont ensuite séchés en réalisant un dernier lavage avec de l'acétonitrile. Un nouveau flacon de protéase ArgC (Promega) est utilisé et repris avec le tampon d'incubation (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 50 mM, EDTA 2 mM).

5 µl de protéase ArgC (10 ng/µl) sont ajoutés manuellement + 45 µl de tampon d'incubation (Tris-HCl 50 mM, 50 mM DTT, EDTA 2 mM) dans un premier temps sur chaque morceau de gel séché puis 5 µl de tampon d'activation 10X (Tris-HCl 50 mM, DTT 50 mM, EDTA 2 mM) sont ajoutés pour les 3 heures d'incubation finale. La digestion est arrêtée en utilisant de l'acide formique 10 % et les peptides sont extraits du gel et séchés.

Analyse par LC/MS

Afin de caractériser les peptides issus de la digestion « en-gel » ; le digestat est repris par un tampon de reprise (5 % ACN, 0,1 % TFA) et analysés par nano-LC-MS/MS (NCS3500 UHPLC and QExactive HF, Thermo Fisher Scientific). Le couplage avec la chromatographie liquide (LC), permet de simplifier des mélanges complexes avant l'analyse MS et de la rendre optimale. Les peptides sont échantillonnés sur une pré-colonne (300 µm * 5 mm PepMap C18) et séparés par une nanocolonne (75 µm * 250 mm C18 column, Reprosil, Cluseau). Un gradient d'acétonitrile de 40 min à 300 nL/min est utilisé pour séparer les peptides et les données MS et MS/MS ont été obtenues en utilisant le logiciel Xcalibur (Thermo Fischer Scientific). Une énergie de dissociation de 27 % NCE (*Normalized Collision Energy*) a été utilisée.

Les données ont été dans un premier temps numérisées par le logiciel Mascot Distiller (version 2.5.1, Matrix Science) puis identifiées par Mascot (version 2.6) en rajoutant la séquence de

Leafy K84C dans la base de données de protéines utilisée. L'espace de recherche en tolérance de masse sur les peptides a été anormalement élargi (4 Da) de manière à considérer plusieurs isotopes des peptides qui contiendraient l'élément ruthénium générant un massif isotopique élargi et très différent d'un profil de peptide classique. Afin d'identifier les peptides contenant le catalyseur au ruthénium plusieurs modifications ont été introduites et considérées : **RuCat** « nu » ; **RuCat-ACN** et perte de neutre d'ACN.

Protocole pour les études en masse native (Top-down)

Les échantillons ont été repris par un mélange 5 % ACN/0,1 % TFA pour atteindre une concentration estimée de 0,5 μ M. Ils ont ensuite été analysés en couplage LC/MS en utilisant une colonne dédiée aux protéines à savoir une phase de type C4. De la spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS en mode HCD) a été réalisée également de manière à cibler les parties de la protéine pouvant contenir le greffage **RuCat**.

Dans les deux cas (mode top-down et mode Bottom-up) le logiciel mMass (Version 5.5.0 ; Martin Strohal) a été utilisé afin d'obtenir les données théoriques sur les peptides de digestion ainsi que sur les massifs isotopiques attendus.

2. ICP/AES

La quantité de ruthénium greffée dans les cristaux est mesurée par ICP/AES avec la technique des ajouts dosés. La gamme d'étalonnage comprise entre 3,90 et 1000 μ g/L de ruthénium est réalisée à partir d'une solution commerciale de ruthénium à 1 g/L, par dilution en cascade au demi en partant d'une solution mère à 1000 μ g/L dans HNO₃ 10%. Chaque échantillon est composé des hybrides contenus dans 5 gouttes de cristallisation auxquels est ajouté 580 μ L d'HNO₃ 65 % (ICP grade). La solution est laissée minéraliser 10 h à 60 °C sous agitation, puis transférée dans un Falcon 15 mL et complétée en eau milli-Q jusqu'à un volume final de 6 mL. Avant l'analyse, pour chaque échantillon, un ajout dosé est réalisé par addition d'1 μ L d'une solution à 0,5 g/L de ruthénium soit 0,5 μ g de ruthénium.

3. ICP/MS

La concentration en ruthénium des différents hybrides est mesurée par ICP/MS cinq fois moins consommatrice de cristaux que l'ICP/AES. La gamme d'étalonnage comprise en 0,2 et 200 µg/L de ruthénium est réalisée à partir d'une solution commerciale de ruthénium à 1 g/L, par dilution en cascade au demi en partant d'une solution mère à 1000 µg/L dans HNO₃ 0,5 %. Chaque échantillon est composé des hybrides contenus dans une goutte de cristallisation auxquels sont ajoutés 20 µL d'HNO₃ 65% (ICP grade). La solution est laissée minéraliser pendant 10 h à 60 °C, puis transférée dans un Falcon 15 mL et complétée en eau milli-Q jusqu'à un volume final de 2 mL.

4. Spectroscopie Raman à résonance in crystallo

L'échantillon à 100 K est aligné au point focal du laser d'excitation (785 nm) à l'aide d'un goniomètre. Le cristal est ensuite orienté de manière à obtenir le meilleur rapport signal sur bruit. Chaque spectre Raman est enregistré entre 200-1000 cm⁻¹ et résulte d'une moyenne de 100 spectres accumulés chacun pendant 30 s. Tous les traitements ainsi que l'analyse spectrale ont été réalisés à l'aide du logiciel Wire 2.0 (Remishaw).

V. Procédures générale de catalyses avec les hybrides

Les catalyses sont réalisées avec un rapport catalyseur : photosensibilisateur : substrat : AE de 1:0,82:82:164.

Chaque catalyse est réalisée en réunissant les hybrides (**RuCat-Leafy K84C**, **RuPhot-Leafy K84C** et **RuCat/RuPhot-Leafy K84C**) issus de cinq gouttes de cristallisation (correspondant à $609,7 \cdot 10^{-12}$ mol de **RuCat** (1 eq) pour **RuCat-Leafy K84C**) réunis dans un eppendorf de 500 µL auxquelles sont ajoutés de l'acétone (40 µL), une solution de méthylviologène (MV) comme AE à 2,5 mM (40 µL, 82 eq) dans un tampon phosphate 0,1 M pH 6,8, une solution de bromothioanisole comme substrat à 5mM (10 µL, 164 eq) dans l'acétone.

- Pour les hybrides **RuCat-Leafy K84C** (1 eq) est ajoutée une solution de photosensibilisateur [Ru(bpy)₃]Cl₂ à 50 µM (10 µL, 0,82 eq) dans un tampon phosphate 0,1 M pH 6,8.

- Pour les hybrides **RuPhot-Leafy K84C** (0,82 eq) est ajoutée d'une solution de **NH₂-RuCat-Cl** comme catalyseur à 10 µM (10 µL, 1 eq) dans l'acétone.

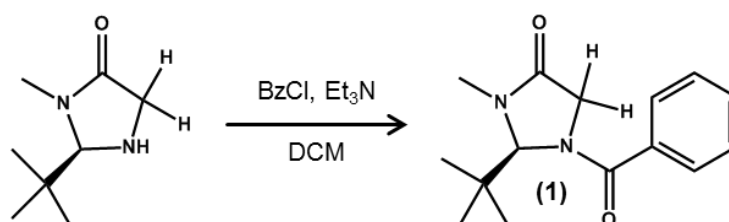
- Pour les hybrides **RuCat/RuPhotocLeafy K84C** aucun ajout supplémentaire.

Le mélange réactionnel est ensuite irradié à 480 nm (LED bleues, 10mW/cm²) pendant 24 h, puis extrait deux fois à l'acétate d'éthyle (2 x 40 µL) et la phase organique analysée en HPLC afin de déterminer la quantité de produit d'oxydation formé.

VI. Synthèses NMR-Bio

A. Synthèse stéréosélective de l'alanine deutérée ¹³CHD₂

Synthèse du (2S)-1-Benzoyl-2-(tbutyl)-3-methylimidazoline-4-one (**1**)^{187,188}



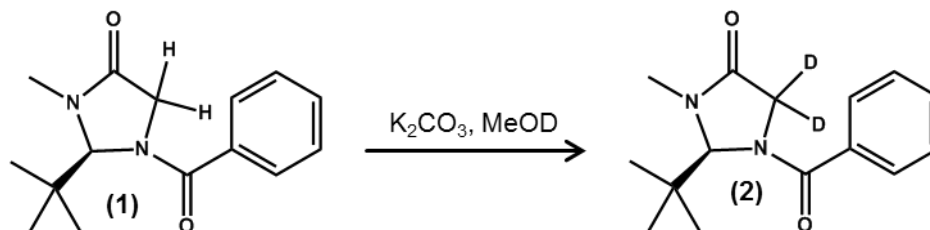
A une solution de (-)-(2R)-2-(tbutyl)-3-methyl-4-imidazolidinone (20,0 g, 74,0 mmol, 1,0 eq) dans du dichlorométhane (300 mL) à température ambiante et sous atmosphère inerte est ajouté la triéthylamine (22,5 g, 222,0 mmol, 3,0 eq). Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à 0°C et le chlorure de benzoyle est ajouté goutte à goutte (15,6 g, 111,0 mmol, 1,5 eq). La solution est laissée sous agitation pendant 16h. L'excès de chlorure de benzoyle est neutralisé par l'ajout d'une solution de NaOH 2,5 M (100 mL) et laissé sous agitation pendant 10 min avant addition d'une solution saturée de NaHCO₃ (150 mL). Les phases sont séparées, puis la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3x250 mL). Les phases organiques sont réunies puis séchées sur Na₂SO₄. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'une huile. Des précipitations successives avec de l'éther diéthylique permettent d'obtenir une poudre cristalline blanche avec un rendement quantitatif (19,6 g).

Les données spectroscopiques (RMN ¹H, ¹³C et MS) correspondent à celles trouvées dans la littérature.^{187,188}

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 7,60-7,46 (5H, m, Ar), 5,68 (1H, s, H-C(2)), 4,11 (2H, d, 15,2 Hz, H₂-C(5)), 2,99 (3H, s, N-Me), 1,10 (9H, s, tBu).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 171,5 (COPh), 164,2 (C-4), 134,2 (Ar), 131,5 (Ar), 128,5 (Ar), 127,9 (Ar), 80,7 (C-2), 66,9 (C-5), 39,7 ((C(Me)₃)), 31,5 (N-CH₃), 25,9 ((CH₃)₃).

ESI-MS (m/z) (intensité relative) : 261 [M+H⁺] (100 %)

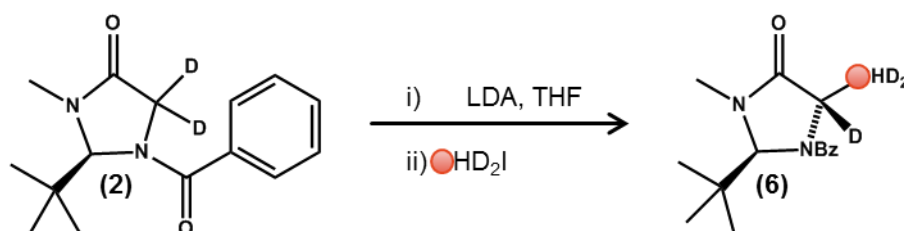
(S)-1-Benzoyl-2-(tbutyl)-3-methylimidazoline-4-one-5-D₂ (2)

A une solution de **(1)** (19,6 g, 74,0 mmol, 1,0 eq) dans du méthanol deutéré CH₃OD (347,3 g, 10508 mol, 142,0 eq) est ajouté du K₂CO₃ (5,2 g, 37,0 mmol, 0,5 eq). Le mélange est chauffé à 60 °C pendant 3 h. Le méthanol est évaporé sous pression réduite, puis le résidu est resuspendu dans un minimum de dichlorométhane et filtré afin d'ôter le K₂CO₃. Le filtrat est évaporé sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'une poudre blanche (19,4 g; 100 %)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,62-7,40 (m, 5H, Ar), 5,62 (s, 1H, H-C(2)), 3,07 (s, 3H, N-CH₃), 1,11 (s, tBu, 9H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 171,6 (COPh), 169,3 (CO), 164,2 (C-4), 134,4 (CH), 131,5 (CH), 128,6 (CH), 128,1 (CH), 80,9 (C(2)), 52,4 (m, D₂C(5)), 39,8 ((C(Me)₃)), 31,6 (N-CH₃), 26,1((CH₃)₃).

ESI-MS (m/z) (intensité relative) (CDCl₃-CH₃OH) : 285 [M+Na⁺] (30 %), 264 [M+2H⁺] (100 %), 263 [M+H⁺] (50 %)

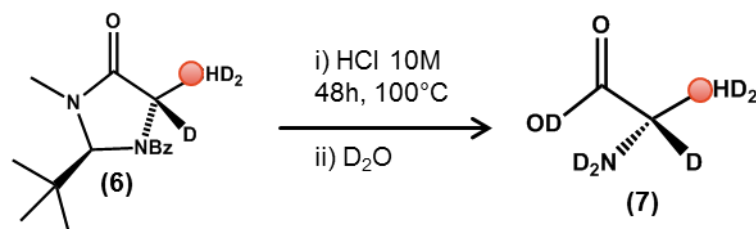
(S)-1-benzoyl-2-(*t*butyl)-3-[5- D_2]-methyl)-imidazolidine-4-one (6)

Une solution de **(2)** (19,4 g, 74,0 mmol, 1,0 eq) dans du THF distillé (400 mL) est ajoutée lentement par canulage sur une solution de LDA 1,6M (69,4 mL, 111,0 mmol, 1,5 eq) à -78°C , donnant une coloration orange intense caractéristique du carbanion formé. Après 45 minutes à -78°C sous atmosphère inerte, le iodométhane $^{13}\text{CHD}_2\text{I}$ (32,2 g, 222,0 mmol, 3,0 eq) est ajouté. Le milieu réactionnel est encore agité pendant 1h à -78°C . Après retour à température ambiante, la solution est neutralisée avec une solution de NH_4Cl saturée dans D_2O (180 mL), puis de l'éther diéthylique (120 mL) est ajoutée. Les phases sont séparées, puis la phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3x300 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 , puis concentrées sous pression réduite et le produit est précipité dans un grand volume de cyclohexane donnant un solide blanc (15,8 g, 56,8 mmol). Le filtrat est évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (éluant 1 : 1 acétate d'éthyle - hexane) donnant 1,32 g supplémentaires de produit. Les deux solides sont réunis (17,1 g, 83,1 %).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7,61-7,43 (m, 5H, Ar), 5,65 (s, 1H, H-C(2)), 3,06 (s, 3H, N- CH_3), 1,05 (s, *t*Bu, 9H), 0,93 (d, 1H, $J = 129,3$ Hz, $^{13}\text{CHD}_2$).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 172,3 (COPh), 171,1 (CO), 137,0 (C-4), 131,5 (CH), 128,9 (CH), 127,7 (CH), 79,8 (C(2)), 56,9 (m, DC(5)), 40,7 ((C(Me) $_3$)), 32,0 (N- CH_3), 26,3 ((CH_3) $_3$), 18,8 ($^{13}\text{CHD}_2$).

ESI-MS (m/z) (intensité relative) (CH_3OD) : 313 [$\text{M}+\text{MeOD}+\text{D}^+$] (18 %), 301 [$\text{M}+\text{Na}^+$] (68 %), 280 [$\text{M}+\text{D}^+$] (100 %).

2-(D), 3-(D₂), 3-(¹³C)-L-alanine (**7**)

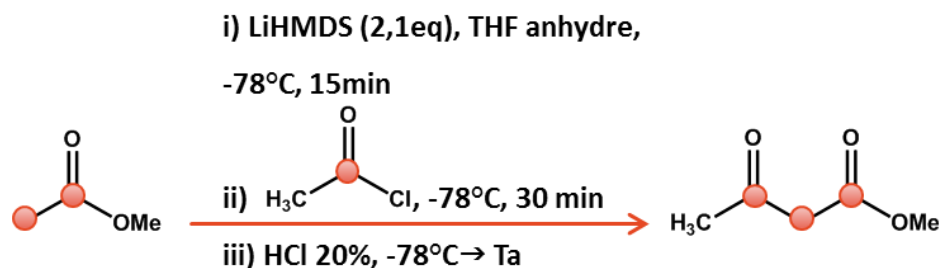
Une solution de **(6)** et **(6')** (17,1 g, 61,5 mmol, 1,0 eq) dans une solution aqueuse de HCl 10 M (430 mL) est portée à reflux pendant 48h. Après retour à température ambiante, la solution est lavée avec du dichlorométhane (3x300 mL) afin d'ôter les résidus de la copule chirale. La solution aqueuse est ensuite lyophilisée. Le résidu est repris dans du D₂O (30 mL), puis une solution de NaOD dans D₂O est ajoutée jusqu'à un pH de 4-5. La solution est ensuite filtrée donnant 95 mL d'une solution de **(7)** à 47,0 mg/mL (4,5 g, 76 %) avec un taux mineur de protonation en C-2 (≈10 %) et la présence de 10 % de l'isomère *D* (détermination par HPLC, colonne CROWNPAK® CR-I(+) (150*3mm, 5µm) Daicel Inc., élution HClO₄ pH=1.5 / ACN (80/20) 0,2 mL/min, *D*-alanine t_R = 4,53 min, *L*-alanine t_R = 6,66 min).

RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ 1.48 (d, 1H, J = 129.1 Hz, ¹³CHD₂).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ 171.1 (CO), 50.5 (C(2)), 15.8 (¹³CHD₂).

ESI-MS (m/z) (intensité relative) (CH₃OD) : 119 (M+Na⁺, 10 %), 120 (M+H+Na⁺, 100 %), 121 (M+D+Na⁺, 100 %), 96 (M⁺, 40 %), 97 (M+H⁺, 100 %), 98 (M+D⁺, 100 %).

B. Synthèse de l'acétoacétate d'éthyle sélectivement marqué ^{13}C , D^{181}



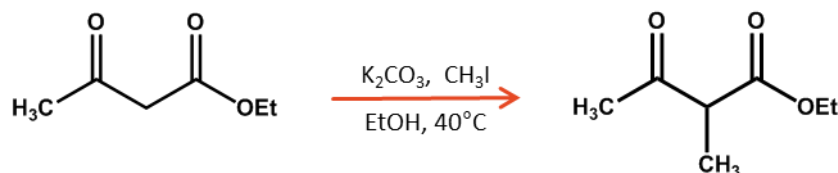
A une solution de LiHMDS (7,8 g, 46,6 mmol, 2,1 eq) dans du THF fraîchement distillé (150 mL) sous atmosphère inerte et à -78°C est ajouté lentement au goutte à goutte le 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -acétate d'éthyle (2,0 g, 22,2 mmol, 1,0 eq). L'agitation est maintenue 15 min à -78 °C avant l'ajout goutte à goutte du 1- ^{13}C -chlorure d'acétyle (1,60 mL, 22,2 mmol, 1,0 eq). Le mélange réactionnel est agité 30 min supplémentaires à -78°C avant d'être neutralisé par une solution de HCl 20% (15 mL) et laissé revenir à température ambiante. Les phases sont séparées, puis la phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique (3x200 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution saturée de NaHCO_3 (300 mL) séchées sur Na_2SO_4 et concentrées sous pression réduite donnant une huile (2,9 g, 98 %).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 4,17 (dq, $J = 7,1$ Hz, 3,2 Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3,42 (ddd, $J = 130,3$ Hz, 7,0 Hz, 3,5 Hz, 2H, $^{13}\text{CO}-^{13}\text{CH}_2-^{13}\text{CO}$), 2,25 (dd, $J = 7,6$ Hz, 4,7 Hz, 3H, $\text{CH}_3-^{13}\text{CO}$), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 200,6 (dd, $J = 37,6$ Hz, 2,2 Hz, $\text{CH}_3-^{13}\text{CO}-^{13}\text{CH}_2$), 167,1 (dd, $J = 58,0$ Hz, 2,2 Hz, $^{13}\text{CH}_2-^{13}\text{CO}-\text{OEt}$), 61,3 (d, $J = 1,9$ Hz, OCH_2CH_3), 50,1 (dd, $J = 58,0$ Hz, 37,6 Hz, $^{13}\text{CO}-^{13}\text{CH}_2-^{13}\text{CO}$), 30,0 (dd, $J = 42,2$ Hz, 14,2 Hz, $\text{CH}_3-^{13}\text{CO}$), 1,26 (d, $J = 1,9$ Hz, OCH_2CH_3).

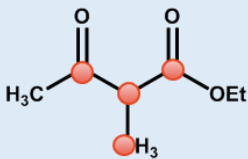
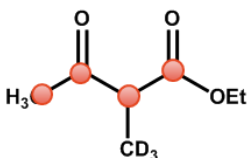
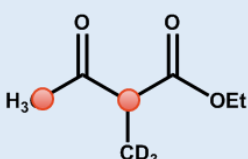
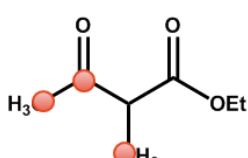
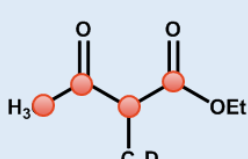
C. Synthèse racémique de l'acétolactate sélectivement marqué $^{13}\text{C},\text{D}$ - Procédure générale¹⁸⁰

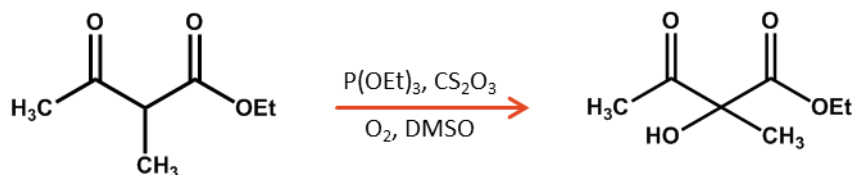
1. Alkylation - Procédure générale¹⁹³



A une solution d'acétoacétate d'éthyle (1,1 eq) dans l'éthanol à 0 °C sont ajoutés le iodométhane (1,1 eq) et par additions successives le carbonate de potassium (1,1 eq). La solution est agitée à 0 °C pendant 2 h puis à température ambiante pendant 16 h. L'avancement de la réaction est suivi par RMN (CDCl_3), puis la suspension est concentrée au 5ème sous pression réduite avant d'ajouter un grand volume d'éther diéthylique pour conduire à la précipitation de la majorité du carbonate de potassium. La solution est filtrée puis lavée avec une solution de NaCl saturée. La phase aqueuse est ensuite extraite avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 puis concentrée sous vide donnant une huile incolore.

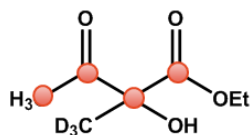
	Structure	Rdt	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)
ProS		78 %	δ 4,22 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3,56-3,47 (m, 1H, $\text{CH}^{13}\text{CH}_3$), 2,26 (s, 3H, CH_3CO), 1,37 (d, $J = 130,4$ Hz, 3H, $^{13}\text{CH}_3$), 1,29 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3)
ProS $^{13}\text{CHD}_2$		69 %	δ 4,22 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3,53-3,49 (m, 1H, $\text{CH}^{13}\text{CHD}_2$), 2,26 (s, 3H, CH_3CO), 1,37 (dm, $J = 127,5$ Hz, 1H, $^{13}\text{CHD}_2$), 1,29 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3)
ProS $[\text{U}]^{13}\text{C}-^{13}\text{CHD}_2$		83 %	δ 4,17 (dq, $J = 9,0$ Hz, 3,0 Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3,46 (dm, $J = 129,2$ Hz, 1H, $^{13}\text{CH}^{13}\text{CHD}_2$), 2,22 (dd, $J = 126,0$ Hz, 3,0 Hz, 3H, $^{13}\text{CH}_3\text{CO}$), 1,41 (dm, $J = 131,3$ Hz, 1H, $^{13}\text{CHD}_2$), 1,25 (t, $J = 9,0$ Hz, 3H, OCH_2CH_3)
ProS 1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ - $^{13}\text{CHD}_2$		54 %	δ 4,22 (dm, 2H, OCH_2CH_3), 3,49 (dm, $J = 137,6$ Hz, 1H, $^{13}\text{CH}^{13}\text{CHD}_2$), 2,25 (d, $J = 5,9$ Hz, 3H, $^{13}\text{CH}_3\text{CO}$), 1,33 (dm, $J = 131,5$ Hz,

ProS 1,2,3- ¹³ C ₃ - ¹³ CH ₃		57 %	<p>1H, ¹³CHD₂), 1,29 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃)</p> <p>δ 4,20 (dq, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3,0Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,50 (dm, <i>J</i> = 130,6 Hz, 1H, ¹³CH-¹³CH₃), 2,24 (d, <i>J</i> = 5,8 Hz, 3H, ¹³CH₃CO), 1,34 (dm, <i>J</i> = 135,6 Hz, 3H, ¹³CH₃), 1,28 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃)</p>
ProR [U] ¹³ C		97 %	<p>δ 4,20 (dq, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3,2Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,47 (dt, <i>J</i> = 130,2 Hz, 7,2 Hz, 1H, ¹³CH-CD₃), 2,24 (dd, <i>J</i> = 127,8 Hz, 6,0 Hz, 3H, ¹³CH₃CO), 1,27 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃)</p>
ProR 2,4- ¹³ C ₂		61 %	<p>δ 4,21 (q, <i>J</i> = 7,1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,49 (d, <i>J</i> = 130,2 Hz, 1H, ¹³CH-CD₃), 2,25 (d, <i>J</i> = 128,1 Hz, 3H, ¹³CH₃CO), 1,29 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃)</p>
ProY		100 %	<p>δ 4,21 (q, <i>J</i> = 7,1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,56-3,45 (m, 1H, CH-¹³CH₃), 2,26 (dd, <i>J</i> = 127,9 Hz, 6,0 Hz, 3H, ¹³CH₃CO), 1,38 (dm, <i>J</i> = 132,4 Hz, 3H, ¹³CH₃), 1,30 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃)</p>
Proy ₂		87 %	<p>δ 4,20 (dq, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3,3 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,31 (dt, <i>J</i> = 129,8 Hz, 7,1 Hz, 1H, ¹³CH-CD₃), 2,22 (dd, <i>J</i> = 127,9 Hz, 6,0 Hz, 3H, ¹³CH₃CO), 1,27 (t, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃)</p>

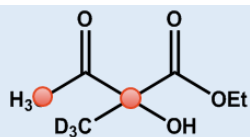
2. Hydroxylation - Procédure générale¹⁷⁹

A une solution 2-méthyl-3-oxobutanoate d'éthyle (1,0 eq) dans du DMSO préalablement saturé en O₂ est ajouté le carbonate de césium (0,2 eq), puis la triéthylphosphite (0,2 eq). La réaction est agitée sous atmosphère d'O₂ pendant 16 h. De l'éther diéthylique est alors ajoutée au mélange qui est ensuite lavé avec une solution aqueuse de NaCl saturée. Les phases aqueuses sont réextraites à l'éther diéthylique. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na₂SO₄ et concentrées sous vide donnant une huile jaune-orangée.

	Structure	Rdt	RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃)
ProS		65 %	δ 4,25 (q, J = 7,1 Hz, 2H, OCH ₂ CH ₃), 2,27 (s, 3H, CH ₃ CO), 1,57 (d, J = 130,0 Hz, 3H, ¹³ CH ₃), 1,33 (t, J = 7,1 Hz, 3H, OCH ₂ CH ₃)
ProS ¹³ CHD ₂		35 %	δ 4,26 (q, J = 7,1 Hz, 2H, OCH ₂ CH ₃), 2,28 (s, 3H, CH ₃ CO) 1,35 (t, J = 7,1 Hz, 3H, OCH ₂ CH ₃), 1,33 (dm, J = 129,0 Hz, 1H, ¹³ CHD ₂)
ProS [U] ¹³ C- ¹³ CHD ₂		38 %	δ 4,25 (dq, J = 9,0 Hz, 3,0 Hz, 2H, OCH ₂ CH ₃), 2,27 (dd, J = 128,2 Hz, 3,0 Hz, 3H, ¹³ CH ₃ CO), 1,29 (dm, J = 129,7 Hz, 1H, ¹³ CHD ₂), 1,27 (t, J = 9,0 Hz, 3H, OCH ₂ CH ₃)
ProS 1,2,3- ¹³ C ₃ - ¹³ CHD ₂		58 %	δ 4,25 (dq, J = 7,1 Hz, 3,2 Hz, 2H, OCH ₂ CH ₃), 2,27 (dd, J = 6,0 Hz, 1,1 Hz, 3H, CH ₃ ¹³ CO), 1,33 (dm, J = 131,5 Hz, 1H, ¹³ CHD ₂), 1,31 (dt, J = 7,1 Hz, 1,0 Hz, 3H, OCH ₂ CH ₃)
ProS 1,2,3- ¹³ C ₃ - ¹³ CH ₃		/	δ 4,25 (dq, J = 7,1 Hz, 3,2 Hz, 2H, OCH ₂ CH ₃), 2,27 (dd, J = 6,0 Hz, 1,1 Hz, 3H, CH ₃ ¹³ CO) 1,35 (dm, J = 139,2 Hz, 3H, ¹³ CH ₃), 1,28 (dt, J = 7,1 Hz, 1,0 Hz, 3H, OCH ₂ CH ₃)

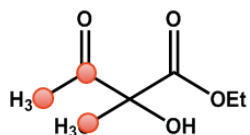
ProR [U]¹³C

62 %
 δ 4,27 (dq, $J = 7,2$ Hz, 3,3 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,29 (dd, $J = 128,9$ Hz, 6,2 Hz, 3H, ¹³CH₃CO) 1,31 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, OCH₂CH₃)

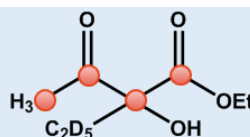
ProR 2,4-¹³C₂

94 %
 δ 4,27 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,28 (d, $J = 128,8$ Hz, 3H, ¹³CH₃CO) 1,31 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, OCH₂CH₃)

ProY



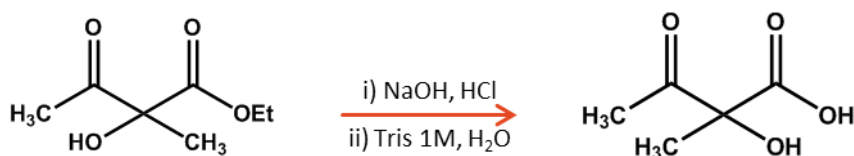
58 %
 δ 4,27 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,30 (dd, $J = 128,8$ Hz, 6,1 Hz, 3H, ¹³CH₃CO), 1,61 (dd, $J = 130,3$ Hz, 4,0 Hz 3H, ¹³CH₃), 1,31 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, OCH₂CH₃)

ProY₂

86 %
 δ 4,26 (m, 2H, OCH₂CH₃), 2,28 (dd, $J = 128,7$ Hz, 6,2 Hz, 3H, ¹³CH₃CO) 1,30 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, OCH₂CH₃)

3. Hydrolyse - Procédure générale

a) Hydrolyse simple

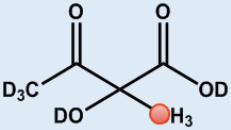
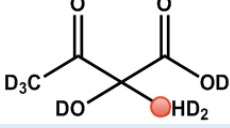
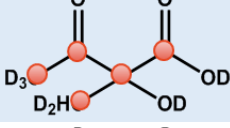
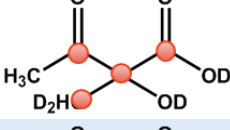



A une solution 2-hydroxy-2-méthyl-3-oxobutanoate d'éthyle (1,0 eq) dans H₂O, 0,4 eq d'une solution de NaOH 2,5 M dans H₂O est additionné au pousse seringue, sous argon et en 40 minutes. Dès la fin de l'addition, un échantillon est prélevé et une RMN dans D₂O est réalisée afin de déterminer le pourcentage de conversion (Rapport entre la quantité d'éthanol formé (quadruplet à 3,6 ppm, 2H) (référence interne) et la quantité de produit de départ restante (doublet à 2,52 ppm, 1,5H). La quantité de solution de soude nécessaire pour obtenir un équivalent est rajoutée en 30 minutes au pousse seringue. Une nouvelle fois, un échantillon est prélevé et une RMN dans D₂O est réalisée afin de valider la fin de l'hydrolyse. La solution est neutralisée (\approx pH 7) **immédiatement** par addition d'une solution de HCl concentrée puis tamponnée avec du Tris-HCl 1,0 M, pH 7,5 dans H₂O. La solution est ensuite lyophilisée afin de remplacer H₂O par un volume équivalent de D₂O, puis dosée par RMN en additionnant 5 μ L de méthanol ou d'acétonitrile servant de référence interne. Le produit final est obtenu en solution dans D₂O, est aliquoté dans des cryotubes (60 mg/cryotube) conservés à -80 °C.

	Structure	Rdt	RMN ¹ H (300 MHz, D ₂ O)
ProR [U] ¹³ C		55 %	2,22 (dd, $J = 128,7$ Hz, 6,0 Hz, 3H, ¹³ CH ₃ CO)
ProR 2,4- ¹³ C ₂		66 %	2,21 (dd, $J = 128,7$ Hz, 6,0 Hz, 3H, ¹³ CH ₃ CO)
Pro γ ₂		83%	2,22 (dd, $J = 128,6$ Hz, 5,8 Hz, 3H, ¹³ CH ₃ CO)

b) Hydrolyse et échange H/D en position C4

A une solution 2-hydroxy-2-méthyl-3-oxobutanoate d'éthyle dans D₂O, 0,4 équivalent d'une solution de NaOD 2,5 M dans D₂O est additionné au pousse seringue, en 40 minutes, sous argon. Dès la fin de l'addition, un échantillon est prélevé et une RMN dans D₂O est réalisée afin de calculer le pourcentage de conversion (Rapport entre la quantité de produit hydrolysé (singulet à 1,65 ppm) et la quantité de produit de départ (singulet à 1,8 ppm)). La quantité de solution de NaOD 2,5 M à additionner (1,1 équivalent de NaOD finale) est déterminée et rajoutée en 30 minutes au pousse seringue. Dès la fin de l'addition, une extraction à l'éther diéthylique est réalisée afin de retirer le produit secondaire dont les signaux RMN empêche un bon suivi de l'échange H/D sur le méthyl en C4 (multiplet \approx 2,2 ppm). L'échange H/D sur le méthyle en C4 (multiplet \approx 2,2 ppm) est suivi par RMN par ajout successif de NaOD 2,5 M jusqu'à ce que l'intégrale du multiplet de l'éthanol (quadruplet à 3,6 ppm) atteigne la valeur de 2 quand le singulet du composé à 1,65 ppm intègre pour 1,5. La réaction est **immédiatement** neutralisée avec une solution de DCl concentrée jusqu'à pH neutre, puis tamponnée avec du Tris-HCl 1,0 M, pH 7,5 dans D₂O. La solution est ensuite dosée par RMN en ajoutant 5 μ L de méthanol ou d'acétonitrile servant de référence interne. Le produit final obtenu en solution dans D₂O, est aliquoté dans des cryotubes (60 mg/cryotube) conservé à -80 °C.

	Structure	Rdt	RMN ¹ H (300 MHz, D ₂ O)
ProS		78%	δ 1,41 (d, 3H, $J = 129,3$ Hz, ¹³ CH ₃)
ProS ¹³ CHD ₂		98%	δ 1,39 (d, 1H, $J = 128,8$ Hz, ¹³ CHD ₂)
ProS [U] ¹³ C- ¹³ CHD ₂		79%	δ 1,38 (dm, 1H, $J = 128,7$ Hz, ¹³ CHD ₂)
ProS 1,2,3- ¹³ C ₃ - ¹³ CHD ₂		80%	δ 1,56 (dm, 1H, $J = 131,5$ Hz, ¹³ CHD ₂)
ProY		86%	δ 1,42 (dd, 3H, $J = 129,3$ Hz, 3,8 Hz, ¹³ CH ₃)

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- (1) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press, 2000.
- (2) de Marco, B. A.; Rechelo, B. S.; Tócoli, E. G.; Kogawa, A. C.; Salgado, H. R. N. *Saudi Pharm.J.* **2019**, *27*, 1.
- (3) Guo, Z.; Liu, B.; Zhang, Q.; Deng, W.; Wang, Y.; Yang, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3480.
- (4) Védrine, J. C. *ChemSusChem* **2019**, *12*, 577.
- (5) Evans, D.; Osborn, J. A.; Wilkinson, G. J. *Chem. Soc. A*, **1968**, 3133.
- (6) In *Access to Chemistry*; Jones, A. V., Clemmet, M., Higton, A., Golding, E., Eds.; The Royal Society of Chemistry: 1999, p 199.
- (7) *Chirality* **1992**, *4*, 338.
- (8) *Catalytic Asymmetric Synthesis, Second Edition, Edited by Iwao Ojima*; 2nd ed.; Wiley-VCH, 2000.
- (9) Bhushan, B. *Philos. Trans. R. Soc. A-Math. Phys. Eng. Sci.* **2009**, *367*, 1445.
- (10) Sheldon, R. A.; Pereira, P. C. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2678.
- (11) Clouthier, C. M.; Pelletier, J. N. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585.
- (12) Nelson, N.; Ben-Shem, A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 971.
- (13) Johnson, Matthew P. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 255.
- (14) Umena, Y.; Kawakami, K.; Shen, J.-R.; Kamiya, N. *Nature* **2011**, *473*, 55.
- (15) Nelson, N.; Yocum, C. F. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 521.
- (16) Herrero, C.; Lassalle-Kaiser, B.; Leibl, W.; Rutherford, A. W.; Aukauloo, A. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 456.
- (17) Wang, X.; Xu, C.; Cai, X.; Wang, Q.; Dai, S. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2191.
- (18) Zhang, B.; Sun, L. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 2216.
- (19) Tong, L.; Thummel, R. P. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6591.
- (20) Ashford, D. L.; Gish, M. K.; Vannucci, A. K.; Brennaman, M. K.; Templeton, J. L.; Papanikolas, J. M.; Meyer, T. J. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 13006.
- (21) Kärkäs, M. D.; Verho, O.; Johnston, E. V.; Åkermark, B. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 11863.
- (22) Zahran, Z. N.; Tsubonouchi, Y.; Mohamed, E. A.; Yagi, M. *ChemSusChem* **2019**, *12*, 1775.
- (23) Takeuchi, K. J.; Thompson, M. S.; Pipes, D. W.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 1845.

- (24) Kalyanasundaram, K. *Coord. Chem. Rev.* **1982**, *46*, 159.
- (25) Teplý, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2011**, *76*, 859.
- (26) Prier, C. K.; Rankic, D. A.; MacMillan, D. W. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 5322.
- (27) Demas, J. N.; Crosby, G. A. *J. Mol. Spectrosc.* **1968**, *26*, 72.
- (28) Dongare, P.; Myron, B. D. B.; Wang, L.; Thompson, D. W.; Meyer, T. J. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *345*, 86.
- (29) Kärkäs, M. D.; Åkermark, B. *Chem. Rec.* **2016**, *16*, 940.
- (30) Gersten, S. W.; Samuels, G. J.; Meyer, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4029.
- (31) Chen, C.; Li, Y.; Zhao, G.; Yao, R.; Zhang, C. *ChemSusChem* **2017**, *10*, 4403.
- (32) Kamdar, J. M.; Grotjahn, D. B. *Molecules* **2019**, *24*, 494.
- (33) Weinberg, D. R.; Gagliardi, C. J.; Hull, J. F.; Murphy, C. F.; Kent, C. A.; Westlake, B. C.; Paul, A.; Ess, D. H.; McCafferty, D. G.; Meyer, T. J. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4016.
- (34) Shimoyama, Y.; Ishizuka, T.; Kotani, H.; Kojima, T. *ACS Catal.* **2019**, *9*, 671.
- (35) Moyer, B. A.; Sipe, B. K.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 1475.
- (36) Dobson, J. C.; Seok, W. K.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 1513.
- (37) Che, C. M.; Lai, T. F.; Wong, K. Y. *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 2289.
- (38) Roecker, L.; Dobson, J. C.; Vining, W. J.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 779.
- (39) Goldstein, A. S.; Beer, R. H.; Drago, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2424.
- (40) Che, C.-M.; Cheng, K.-W.; Chan, M. C. W.; Lau, T.-C.; Mak, C.-K. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7996.
- (41) Bryant, J. R.; Mayer, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10351.
- (42) Chavarot, M.; Ménage, S.; Hamelin, O.; Charnay, F.; Pécaut, J.; Fontecave, M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 4810.
- (43) Huynh, M. H. V.; Witham, L. M.; Lasker, J. M.; Wetzler, M.; Mort, B.; Jameson, D. L.; White, P. S.; Takeuchi, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 308.
- (44) Hamelin, O.; Rimboud, M.; Pécaut, J.; Fontecave, M. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 5354.
- (45) Hamelin, O.; Ménage, S.; Charnay, F.; Chavarot, M.; Pierre, J.-L.; Pécaut, J.; Fontecave, M. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 6413.
- (46) Hirai, Y.; Kojima, T.; Mizutani, Y.; Shiota, Y.; Yoshizawa, K.; Fukuzumi, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5772.
- (47) Benet-Buchholz, J.; Comba, P.; Llobet, A.; Roeser, S.; Vadivelu, P.; Wadehohl, H.; Wiesner, S. *Dalton Trans.* **2009**, 5910.

- (48) Benet-Buchholz, J.; Comba, P.; Llobet, A.; Roeser, S.; Vadivelu, P.; Wiesner, S. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 3315.
- (49) Kojima, T.; Hirai, Y.; Ishizuka, T.; Shiota, Y.; Yoshizawa, K.; Ikemura, K.; Ogura, T.; Fukuzumi, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8449.
- (50) Shimoyama, Y.; Ishizuka, T.; Kotani, H.; Shiota, Y.; Yoshizawa, K.; Mieda, K.; Ogura, T.; Okajima, T.; Nozawa, S.; Kojima, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14041.
- (51) Dhuri, S. N.; Cho, K.-B.; Lee, Y.-M.; Shin, S. Y.; Kim, J. H.; Mandal, D.; Shaik, S.; Nam, W. J. *Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8623.
- (52) Ishizuka, T.; Kotani, H.; Kojima, T. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 16727.
- (53) Li, F.; Yu, M.; Jiang, Y.; Huang, F.; Li, Y.; Zhang, B.; Sun, L. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8949.
- (54) Ohzu, S.; Ishizuka, T.; Hirai, Y.; Fukuzumi, S.; Kojima, T. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1563.
- (55) Chen, W.; Rein, F. N.; Rocha, R. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9672.
- (56) Chen, W.; Rein, F. N.; Scott, B. L.; Rocha, R. C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5595.
- (57) Hamelin, O.; Guillo, P.; Loiseau, F.; Boissonnet, M. F.; Menage, S. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 7952.
- (58) Guillo, P.; Hamelin, O.; Batat, P.; Jonusauskas, G.; McClenaghan, N. D.; Ménage, S. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 2222.
- (59) Kozawa, K.; Inagaki, A.; Akita, M. *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 290.
- (60) Li, T.-T.; Li, F.-M.; Zhao, W.-L.; Tian, Y.-H.; Chen, Y.; Cai, R.; Fu, W.-F. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 183.
- (61) Pincus, M. R.; Zimmerman, S. S.; Scheraga, H. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 2629.
- (62) DiCosimo, R.; McAuliffe, J.; Poulouse, A. J.; Bohlmann, G. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6437.
- (63) Hutchison, C. A.; Phillips, S.; Edgell, M. H.; Gillam, S.; Jahnke, P.; Smith, M. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6551.
- (64) Padhi, S. K.; Fujii, R.; Legatt, G. A.; Fossum, S. L.; Berchtold, R.; Kazlauskas, R. J. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 863.
- (65) Arnold, F. H. In *Nobel Prize in chemistry 2018 for directed evolution of enzymes*.
- (66) Markel, U.; Sauer, D. F.; Schiffels, J.; Okuda, J.; Schwaneberg, U. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 4454.
- (67) Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801.
- (68) Chen, X.; Gao, C.; Guo, L.; Hu, G.; Luo, Q.; Liu, J.; Nielsen, J.; Chen, J.; Liu, L. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 4.

- (69) Goeddel, D. V.; Kleid, D. G.; Bolivar, F.; Heyneker, H. L.; Yansura, D. G.; Crea, R.; Hirose, T.; Kraszewski, A.; Itakura, K.; Riggs, A. D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, *76*, 106.
- (70) Kung, S. H.; Lund, S.; Murarka, A.; McPhee, D.; Paddon, C. J. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*.
- (71) Paddon, C. J.; Westfall, P. J.; Pitera, D. J.; Benjamin, K.; Fisher, K.; McPhee, D.; Leavell, M. D.; Tai, A.; Main, A.; Eng, D.; Polichuk, D. R.; Teoh, K. H.; Reed, D. W.; Treynor, T.; Lenihan, J.; Jiang, H.; Fleck, M.; Bajad, S.; Dang, G.; Dengrove, D.; Diola, D.; Dorin, G.; Ellens, K. W.; Fickes, S.; Galazzo, J.; Gaucher, S. P.; Geistlinger, T.; Henry, R.; Hepp, M.; Horning, T.; Iqbal, T.; Kizer, L.; Lieu, B.; Melis, D.; Moss, N.; Regentin, R.; Secret, S.; Tsuruta, H.; Vazquez, R.; Westblade, L. F.; Xu, L.; Yu, M.; Zhang, Y.; Zhao, L.; Lievens, J.; Covello, P. S.; Keasling, J. D.; Reiling, K. K.; Renninger, N. S.; Newman, J. D. *Nature* **2013**, *496*, 528.
- (72) Lewis, J. C.; Ellis-Guardiola, K. In *Artificial Metalloenzymes and MetalloDNAzymes in Catalysis*; Wiley-VCH, Ed. 2018, p 1.
- (73) Yamamura, K.; Kaiser, E. T. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 830.
- (74) Wilson, M. E.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306.
- (75) Schwizer, F.; Okamoto, Y.; Heinisch, T.; Gu, Y.; Pellizzoni, M. M.; Lebrun, V.; Reuter, R.; Kohler, V.; Lewis, J. C.; Ward, T. R. *Chem. Rev.* **2017**.
- (76) Okrasa, K.; Kazlauskas, R. *J. Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1587.
- (77) Fernández-Gacio, A.; Codina, A.; Fastrez, J.; Riant, O.; Soumillion, P. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1013.
- (78) Kokubo, T.; Sugimoto, T.; Uchida, T.; Tanimoto, S.; Okano, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 769.
- (79) Abe, S.; Niemeyer, J.; Abe, M.; Takezawa, Y.; Ueno, T.; Hikage, T.; Erker, G.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10512.
- (80) Deuss, P. J.; den Heeten, R.; Laan, W.; Kamer, P. C. *Chemistry* **2011**, *17*, 4680.
- (81) Charon, M.-H.; Wu, L.-F.; Piras, C.; de Pina, K.; Mandrand-Berthelot, M.-A.; Fontecilla-Camps, J. C. *J. Mol. Biol.* **1994**, *243*, 353.
- (82) Cavazza, C.; Bochot, C.; Rousselot-Pailley, P.; Carpentier, P.; Cherrier, M. V.; Martin, L.; Marchi-Delapierre, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Ménage, S. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 1069.
- (83) Esmieu, C.; Cherrier, M. V.; Amara, P.; Girgenti, E.; Marchi-Delapierre, C.; Odon, F.; Iannello, M.; Jorge-Robin, A.; Cavazza, C.; Ménage, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3922.
- (84) Cavazza, C.; Marchi-Delapierre, C.; Ménage, S. In *Artificial Metalloenzymes and MetalloDNAzymes in Catalysis*; Wiley-VCH, Ed. 2018, p 199.

- (85) Chalker, J. M.; Bernardes, G. J.; Lin, Y. A.; Davis, B. G. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 630.
- (86) Basle, E.; Joubert, N.; Pucheault, M. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 213.
- (87) Minten, I. J.; Abello, N.; Schooneveld-Bergmans, M. E. F.; van den Berg, M. A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6215.
- (88) Stewart, K. D.; Radziejewski, C.; Kaiser, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3480.
- (89) Davies, R. R.; Distefano, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11643.
- (90) Davies, R. R.; Kuang, H.; Qi, D.; Mazhary, A.; Mayaan, E.; Distefano, M. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 79.
- (91) McKay, C. S.; Finn, M. G. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1075.
- (92) Yokoi, N.; Inaba, H.; Terauchi, M.; Stieg, A. Z.; Sanghamitra, N. J. M.; Koshiyama, T.; Yutani, K.; Kanamaru, S.; Arisaka, F.; Hikage, T.; Suzuki, A.; Yamane, T.; Gimzewski, J. K.; Watanabe, Y.; Kitagawa, S.; Ueno, T. *Small* **2010**, *6*, 1873.
- (93) Inaba, H.; Kitagawa, S.; Ueno, T. *Isr. J. Chem.* **2015**, *55*, 40.
- (94) Boutureira, O.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174.
- (95) Zadvornyy, O. A.; Lucon, J. E.; Gerlach, R.; Zorin, N. A.; Douglas, T.; Elgren, T. E.; Peters, J. W. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *106*, 151.
- (96) Zhang, Y.; Park, K.-Y.; Suazo, K. F.; Distefano, M. D. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 9106.
- (97) Yang, H.; Srivastava, P.; Zhang, C.; Lewis, J. C. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 223.
- (98) Srivastava, P.; Yang, H.; Ellis-Guardiola, K.; Lewis, J. C. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7789.
- (99) Knör, G. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *325*, 102.
- (100) Willner, I.; Lapidot, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3625.
- (101) Simaan, A. J.; Mekmouche, Y.; Herrero, C.; Moreno, P.; Aukauloo, A.; Delaire, J. A.; Réglie, M.; Tron, T. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 11743.
- (102) Schneider, L.; Mekmouche, Y.; Rousselot-Pailley, P.; Simaan, A. J.; Robert, V.; Réglie, M.; Aukauloo, A.; Tron, T. *ChemSusChem* **2015**, *8*, 3048.
- (103) Herrero, C.; Nguyen-Thi, N.; Hammerer, F.; Banse, F.; Gagné, D.; Doucet, N.; Mahy, J.-P.; Ricoux, R. *Catalysts* **2016**, *6*, 202.
- (104) Herrero, C.; Quaranta, A.; Ricoux, R.; Trehoux, A.; Mahammed, A.; Gross, Z.; Banse, F.; Mahy, J.-P. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 706.
- (105) Utschig, L. M.; Soltau, S. R.; Tiede, D. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 1.
- (106) Ener, M. E.; Lee, Y.-T.; Winkler, J. R.; Gray, H. B.; Cheruzel, L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 18783.

- (107) Tran, N.-H.; Nguyen, D.; Dwaraknath, S.; Mahadevan, S.; Chavez, G.; Nguyen, A.; Dao, T.; Mullen, S.; Nguyen, T.-A.; Cheruzel, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14484.
- (108) Lam, Q.; Kato, M.; Cheruzel, L. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* **2016**, *1857*, 589.
- (109) Yokoi, N.; Miura, Y.; Huang, C.-Y.; Takatani, N.; Inaba, H.; Koshiyama, T.; Kanamaru, S.; Arisaka, F.; Watanabe, Y.; Kitagawa, S.; Ueno, T. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2074.
- (110) Schneider, C. R.; Manesis, A. C.; Stevenson, M. J.; Shafaat, H. S. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 4681.
- (111) Tabe, H.; Takahashi, H.; Shimoi, T.; Abe, S.; Ueno, T.; Yamada, Y. *Appl. Catal., B* **2018**.
- (112) Sheldon, R. A.; van Pelt, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223.
- (113) Cantone, S.; Ferrario, V.; Corici, L.; Ebert, C.; Fattor, D.; Spizzo, P.; Gardossi, L. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6262.
- (114) Sirisha, V. L.; Jain, A.; Jain, A. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Kim, S.-K., Toldrá, F., Eds.; Academic Press: 2016; Vol. 79, p 179.
- (115) Zhang, S.; Zhang, Z.; Lu, Y.; Rostam-Abadi, M.; Jones, A. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 10194.
- (116) Betancor, L.; Luckarift, H. R. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 566.
- (117) Hartmann, M.; Kostrov, X. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6277.
- (118) Ribeiro, M. H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1883.
- (119) Busto, M. D.; Meza, V.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1177.
- (120) Nunes, M. A. P.; Vila-Real, H.; Fernandes, P. C. B.; Ribeiro, M. H. L. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *160*, 2129.
- (121) Margolin, A. L.; Navia, M. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2204.
- (122) Ueno, T. *Chemistry* **2013**, *19*, 9096.
- (123) Chandel, A. K.; Rao, L. V.; Narasu, M. L.; Singh, O. V. *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *42*, 199.
- (124) Kallenberg, A. I.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 905.
- (125) Iali, W.; Lanoe, P. H.; Torelli, S.; Jouvenot, D.; Loiseau, F.; Lebrun, C.; Hamelin, O.; Menage, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 8415.
- (126) Lopez, S.; Rondot, L.; Cavazza, C.; Iannello, M.; Boeri-Erba, E.; Burzlaff, N.; Strinitz, F.; Jorge-Robin, A.; Marchi-Delapierre, C.; Menage, S. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 3579.
- (127) Lopez, S.; Rondot, L.; Leprêtre, C.; Marchi-Delapierre, C.; Ménage, S.; Cavazza, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 17994.

- (128) Sayou, C.; Nanao, M. H.; Jamin, M.; Posé, D.; Thévenon, E.; Grégoire, L.; Tichtinsky, G.; Denay, G.; Ott, F.; Peirats Llobet, M.; Schmid, M.; Dumas, R.; Parcy, F. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11222.
- (129) Cal, P. M.; Bernardes, G. J.; Gois, P. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 10585.
- (130) Gunnoo, S. B.; Madder, A. *Chembiochem* **2016**, *17*, 529.
- (131) Winter, A.; Egbe, D. A. M.; Schubert, U. S. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2345.
- (132) Odobel, F.; Zabri, H. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 5600.
- (133) Ru, Q.; Xue, Z.; Wang, Y.; Liu, Y.; Li, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 469.
- (134) Berg, Katja E.; Tran, A.; Raymond, Mary K.; Abrahamsson, M.; Wolny, J.; Redon, S.; Andersson, M.; Sun, L.; Styring, S.; Hammarström, L.; Toftlund, H.; Åkermark, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 1019.
- (135) Gurung, A. D., S. *Orient J Chem* **2016**, *32*, 1261.
- (136) Mari, T.; Ken-ichi, I.; Shinobu, I.; Noriharu, N. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2006**, *79*, 1525.
- (137) Keller, S. G.; Pannwitz, A.; Schwizer, F.; Klehr, J.; Wenger, O. S.; Ward, T. R. *Org. Biomo.l Chem.* **2016**, *14*, 7197.
- (138) Sullivan, B. P.; Calvert, J. M.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 1404.
- (139) Radford, R. J.; Nguyen, P. C.; Tezcan, F. A. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 7106.
- (140) Nielsen, M. L.; Vermeulen, M.; Bonaldi, T.; Cox, J.; Moroder, L.; Mann, M. *Nat.Methods* **2008**, *5*, 459.
- (141) Boja, E. S.; Fales, H. M. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3576.
- (142) Castellano, F. N.; Dattelbaum, J. D.; Lakowicz, J. R. *Anal. Biochem.* **1998**, *255*, 165.
- (143) Wasylenko, D. J.; Ganesamoorthy, C.; Koivisto, B. D.; Henderson, M. A.; Berlinguette, C. P. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 2202.
- (144) Breitinger, D. K.; Breiter, R. J. *Mol. Struct.* **1995**, *349*, 45.
- (145) Trávníček, Z.; Matiková-Mařarová, M.; Novotná, R.; Vančo, J.; Štěpánková, K.; Suchý, P. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 937.
- (146) Vergara, A.; D'Errico, G.; Montesarchio, D.; Mangiapia, G.; Paduano, L.; Merlino, A. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 4157.
- (147) Bazylewski, P.; Divigalpitiya, R.; Fanchini, G. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 2964.
- (148) Parker, S. F. *Chem. Phys.* **2013**, *424*, 75.
- (149) Joo, T. H.; Yim, Y. H.; Kim, K.; Kim, M. S. *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93*, 1422.

- (150) Giansanti, P.; Tsiatsiani, L.; Low, T. Y.; Heck, A. J. R. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 993.
- (151) Sehgal, D.; Vijay, I. K. *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 87.
- (152) Ellis, C. D.; Margerum, L. D.; Murray, R. W.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1983**, *22*, 1283.
- (153) Kumar, P.; Chauhan, R. K.; Sain, B.; Jain, S. L. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 4546.
- (154) Grimm, F.; Hartnagel, K.; Wessendorf, F.; Hirsch, A. *Chem. Commun.* **2009**, 1331.
- (155) Beer, P. D.; Szemes, F.; Balzani, V.; Salà, C. M.; Drew, M. G. B.; Dent, S. W.; Maestri, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11864.
- (156) Terpetschnig, E.; Szmackinski, H.; Malak, H.; Lakowicz, J. R. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 342.
- (157) Ferroud, C.; Rool, P.; Santamaria, J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9423.
- (158) Jensen, F.; Greer, A.; Clennan, E. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4439.
- (159) Bonesi, S. M.; Manet, I.; Freccero, M.; Fagnoni, M.; Albini, A. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4844.
- (160) Kuan, S. L.; Bergamini, F. R. G.; Weil, T. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 9069.
- (161) Luo, Q.; Hou, C.; Bai, Y.; Wang, R.; Liu, J. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 13571.
- (162) Wu, J.; Wang, X.; Wang, Q.; Lou, Z.; Li, S.; Zhu, Y.; Qin, L.; Wei, H. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 1004.
- (163) Pieters, B. J. G. E.; van Eldijk, M. B.; Nolte, R. J. M.; Mecinović, J. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 24.
- (164) Anke, K.; Isidoro, L.; Jana, S.; Uwe, K.; Fernando, B.; Carolina, G. S.; Jordi, B. B.; Peter, H.; Antoni, L. *ChemSusChem* **2017**, *10*, 551.
- (165) Panagiotopoulos, A.; Ladomenou, K.; Sun, D.; Artero, V.; Coutsolelos, A. G. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 6732.
- (166) Roy, S.; Bhunia, A.; Schuth, N.; Haumann, M.; Ott, S. *Sustainable Energy & Fuels* **2018**, *2*, 1148.
- (167) Hartley, C. L.; DiRisio, R. J.; Screen, M. E.; Mayer, K. J.; McNamara, W. R. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 8865.
- (168) Engström, K.; Johnston, E. V.; Verho, O.; Gustafson, K. P. J.; Shakeri, M.; Tai, C.-W.; Bäckvall, J.-E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14006.
- (169) Kuramochi, Y.; Sekine, M.; Kitamura, K.; Maegawa, Y.; Goto, Y.; Shirai, S.; Inagaki, S.; Ishida, H. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 10301.
- (170) Guo, M.; Li, H.; Ren, Y.; Ren, X.; Yang, Q.; Li, C. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 6476.
- (171) Conejero-Muriel, M.; Rodríguez-Ruiz, I.; Martínez-Rodríguez, S.; Llobera, A.; Gavira, J. A. *Lab on a Chip* **2015**, *15*, 4083.

- (172) Anastas, P.; Eghbali, N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301.
- (173) Kerfah, R.; Plevin, M. J.; Sounier, R.; Gans, P.; Boisbouvier, J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2015**, *32*, 113.
- (174) Miller, S.; Janin, J.; Lesk, A. M.; Chothia, C. *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 641.
- (175) Goto, N. K.; Gardner, K. H.; Mueller, G. A.; Willis, R. C.; Kay, L. E. *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 369.
- (176) Lichtenecker, R.; Ludwiczek, M. L.; Schmid, W.; Konrat, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5348.
- (177) Tugarinov, V.; Kay, L. E. *J. Biomol. NMR* **2004**, *28*, 165.
- (178) Gans, P.; Hamelin, O.; Sounier, R.; Ayala, I.; Durá, M. A.; Amero, C. D.; Noirclerc-Savoie, M.; Franzetti, B.; Plevin, M. J.; Boisbouvier, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1958.
- (179) Liang, Y.-F.; Jiao, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 548.
- (180) Gans, P.; Boisbouvier, J.; Ayala, I.; Hamelin, O. 2010; Vol. WO2011083356A1.
- (181) Winkel, C.; Buitenhuis, E. G.; Lugtenburg, J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1989**, *108*, 51.
- (182) Scherling, D.; Pleiß, U. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1988**, *25*, 1393.
- (183) Harris, F. L.; Weiler, L. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1939.
- (184) Wang, K.-K.; Wang, P.; Ouyang, Q.; Du, W.; Chen, Y.-C. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 11104.
- (185) Velyvis, A.; Ruschak, A. M.; Kay, L. E. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e43725.
- (186) Barclay, F.; Chrystal, E.; Gani, D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 683.
- (187) R. Amin, M., Durham University, 1996.
- (188) R. Amin, M.; B. Harper, D.; M. Moloney, J.; D. Murphy, C.; A. K. Howard, J.; O'Hagan, D. *Chem. Commun.* **1997**, 1471.
- (189) Fitzi, R.; Seebach, D. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1986**, *25*, 345.
- (190) Carpentier, P.; Royant, A.; Ohana, J.; Bourgeois, D. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 1113.
- (191) Royant, A.; Carpentier, P.; Ohana, J.; McGeehan, J.; Paetzold, B.; Noirclerc-Savoie, M.; Vernede, X.; Adam, V.; Bourgeois, D. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 1105.
- (192) Cui, M.; Wang, F.; Miao, Z.; Xia, Y.; Yan, L.; Ma, Y.; Yao, H.; Ling, H.; Qi, Z. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 65627.
- (193) Nawrat, C. C.; Lewis, W.; Moody, C. J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7872.