



**HAL**  
open science

# Développement de flavo-enzymes artificielles pour la chimie radicalaire et l'activation du dioxygène dans l'eau

Yoan Chevalier

► **To cite this version:**

Yoan Chevalier. Développement de flavo-enzymes artificielles pour la chimie radicalaire et l'activation du dioxygène dans l'eau. Catalyse. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS061 . tel-03593399

**HAL Id: tel-03593399**

**<https://theses.hal.science/tel-03593399>**

Submitted on 2 Mar 2022

**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.

# Développement de flavoenzymes artificielles pour la chimie radicalaire et l'activation du dioxygène dans l'eau.

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°571 : sciences chimiques : molécules, matériaux,  
instrumentation et biosystèmes (2MIB)  
Spécialité de doctorat: Chimie  
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de chimie moléculaire et  
des matériaux d'Orsay, 91405, Orsay, France.  
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 09/06/2020, par**

**Yoan CHEVALIER**

## Composition du Jury

<b>Damien PRIM</b> Professeur, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines	Président
<b>Laurence HECQUET</b> Professeur, Université Clermont Auvergne	Rapportrice
<b>Matthieu RAYNAL</b> Chargé de recherche, CNRS Sorbonne Université	Rapporteur
<b>Jean-Philippe Goddard</b> Professeur, Université Haute Alsace	Examineur
<b>Jean-Pierre MAHY</b> Professeur, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
<b>Frédéric AVENIER</b> Maitre de conférences, Université Paris-Saclay	Co-Directeur de thèse



**Titre :** Développement de flavoenzymes artificielles pour la chimie radicalaire et l'activation du dioxygène dans l'eau.

**Mots clés :** Enzyme artificielle, Flavine, Catalyse, Oxydation.

**Résumé :** Le sujet vise à développer des systèmes artificiels bio-inspirés capables de catalyser d'importantes réactions organiques dans l'eau, dans des conditions douces et en utilisant des réactifs inoffensifs tels que O<sub>2</sub>. Pour cela, nous envisageons de mimer les deux activités principales des flavoenzymes, qui sont capables de catalyser soit des réductions, en délivrant un flux monoélectronique à un partenaire biologique, soit des réactions d'oxydations, par activation réductrice du dioxygène, et ceci avec le même cofacteur flavinique, mais localisé dans différents échafaudages protéiques. Ce projet est basé sur des résultats obtenus récemment, démontrant que l'incorporation de cofacteurs flaviniques (FMN) dans un environnement localement hydrophobe (polyéthylèneimine modifié) peut générer une réductase artificielle capable de collecter des paires d'électrons de NADH et de délivrer des électrons célibataires à un partenaire redox tel que qu'une porphyrine de manganèse (III).

Dans ce contexte, selon les conditions aérobies ou anaérobies, la flavine réduite de ces systèmes pourrait soit délivrer en solution des électrons célibataires pour initier des réactions radicalaires, soit activer le dioxygène pour effectuer des réactions oxydations (Baeyer-Villiger, sulfoxydation, époxydation ...). Nous présentons ici les résultats obtenus pour les réactions de Baeyer-Villiger et de sulfoxydations réalisées dans l'eau en utilisant le premier système catalytique composé d'un cofacteur flavinique naturel (FMN) et d'un polymère fonctionnalisé pour activer directement le dioxygène de l'air dans des conditions douces. Nous démontrons également que le NADH peut soit être remplacé par un réducteur moins coûteux tel que l'ascorbate de sodium soit être recyclé en cours de catalyse grâce à la combinaison de notre système catalytique avec un formiate déshydrogénase naturel (FDH). Finalement, le système a également été testé pour initier des réactions radicalaires en conditions anaérobies.

**Title:** Artificial flavoenzymes for radical chemistry and dioxygen activation in water.

**Keywords:** Artificial enzyme, Flavin, Catalysis, Oxidation.

**Abstract:** The present project aims at developing bioinspired artificial systems capable of catalysing important organic reactions in water, under mild conditions and using harmless reactants such as O<sub>2</sub>. For this purpose, we are mimicking both activities of flavoenzymes, which are capable of catalysing either reduction reactions, by delivering single electrons to a biologic partner, or oxidation reactions, by the reductive activation of O<sub>2</sub>. This project is based on recent results, demonstrating that the incorporation of flavin cofactors (FMN) into the local microenvironment of a water-soluble polymer (modified polyethyleneimine), can generate an artificial reductase capable of collecting electron pairs from NADH and then delivering single electrons to redox partners such as a manganese (III) porphyrin. In this context, depending on the aerobic or anaerobic conditions, the reduced flavin of such

systems could either deliver single electrons in solution to initiate radical chemistry reactions or activate dioxygen to perform catalytic oxidations (Baeyer-Villiger, sulfoxidation, epoxidation...). We Here, we demonstrate present the results obtained for the Baeyer-Villiger and sulfoxidation reactions performed in water using the first catalytic system utilizing based on a natural flavin cofactor to directly activate dioxygen from the air as the unique source of oxidant under mild conditions. In parallel, we present how NADH could can be replaced by a cheaper reductant such as the sodium ascorbate and how we managed to recycle NADH along the reaction thank to the combination of our catalytic system with a natural formate dehydrogenase (FDH). To conclude, the system has also been tested to initiate radical chemistry reactions under anaerobic conditions.



## Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>6</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>9</b>
I.    FLAVOPROTEINES .....	9
1. <i>Généralité sur les cofacteurs flaviniques.....</i>	<i>9</i>
a)    Propriétés redox .....	9
b)    Propriétés spectrales .....	11
c)    Réactivité des flavines libres en solution avec le dioxygène. ....	14
2. <i>Flavines Monooxygénases.....</i>	<i>17</i>
a)    Généralités.....	17
b)    Les monooxygénases .....	18
c)    La para hydroxybenzoate hydroxylase (pHBH).....	20
d)    Baeyer-Villiger Monooxygénases .....	22
e)    Flavin N(5)-Oxide .....	25
3. <i>Les flavines réductases : exemple de la cytochrome P450 réductase .....</i>	<i>27</i>
II.   UTILISATION DE DERIVES FLAVINIQUES POUR LA CATALYSE D' OXYDATION. ....	29
1. <i>Historique.....</i>	<i>30</i>
2. <i>Réactions d'oxydations catalysées par des dérivés flaviniques avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</i>	<i>32</i>
3. <i>Réactions d'oxydations catalysées par des dérivés flaviniques chiraux avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</i>	<i>43</i>
a)    Sulfoxydations asymétriques avec H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	43
b)    Oxydation de Baeyer-Villiger asymétrique avec H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50
4. <i>Réactions d'oxydations catalysées par des dérivés flaviniques avec O<sub>2</sub> .....</i>	<i>53</i>
a)    Sulfoxydations catalysées par des dérivés flaviniques avec O <sub>2</sub> .....	54
b)    Réactions de Baeyer-Villiger catalysées par des dérivés flaviniques avec O <sub>2</sub> .....	59
5. <i>Réaction d'oxydation catalysée par une flavine dans l'eau avec O<sub>2</sub>.....</i>	<i>65</i>
<b>CHAPITRE 2 : FONCTIONNALISATION ET CARACTERISATION DES DIFFERENTS POLYMERES67</b>	
I.    FONCTIONNALISATION DU POLYMERE. ....	67
II.   QUANTIFICATION DES POLYMERES PAR RMN <sup>1</sup> H. ....	69
1. <i>Polymères bifonctionnalisés guanidinium-octyle.....</i>	<i>69</i>
2. <i>Polymères bi et trifonctionnalisés guanidinium-octyle-acide carboxylique.....</i>	<i>73</i>

## Sommaire

III.	POLYMERE CHIRAL.....	77
1.	<i>Synthèse d'un polymère chiral</i> .....	77
2.	<i>Caractérisation du polymère chiral</i> .....	78
IV.	CONCLUSION.....	80
<b>CHAPITRE 3 : ASSEMBLAGE DE L'ENZYME ARTIFICIELLE ET CATALYSE D'OXYDATION .....</b>		<b>81</b>
I.	ETUDE DE L'ENZYME ARTIFICIELLE. ....	81
1.	<i>Incorporation de la FMN dans le polymère modifié</i> .....	81
2.	<i>Etude de la réduction de la FMN par NADH dans l'eau</i> .....	83
a)	Utilisation du polymère modifié PEI <sub>mgo</sub> 2 (0,17/0,17).....	83
b)	Etude de l'influence du pH sur l'oxydation de NADH.....	86
c)	Influence de la nature des polymères sur l'oxydation de NADH.....	87
d)	Influence du substrat sur l'oxydation de NADH .....	88
II.	CATALYSE D'OXYDATION DE BAEYER-VILLIGER UTILISANT O <sub>2</sub> DANS L'EAU.....	89
1.	<i>Première approche pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one</i> .....	89
2.	<i>Optimisation des conditions pour la catalyse d'oxydation</i> .....	92
a)	Influence des proportions polymère/catalyseur sur l'activité catalytique.....	92
b)	Influence du pH sur la catalyse d'oxydation en milieu tamponné. ....	93
c)	Cinétique d'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one .....	94
d)	Influence de la concentration en réducteur sur l'activité catalytique. ....	95
e)	Influence de la nature du polymère sur l'activité catalytique.....	96
f)	Comparaison avec des oxydants chimiques classiques.....	98
3.	<i>Champs d'application de l'enzyme artificielle</i> .....	100
a)	Réaction de Baeyer-Villiger.....	100
b)	Réaction de sulfoxydation .....	101
4.	<i>Etude mécanistique</i> .....	102
5.	<i>Utilisation du polymère chiral pour la catalyse d'oxydation</i> .....	106
III.	CONCLUSION.....	108
<b>CHAPITRE 4 : EVOLUTION DES CONDITIONS CATALYTIQUES.....</b>		<b>110</b>
I.	REPLACEMENT DU NADH PAR L'ASCORBATE DE SODIUM .....	110
1.	<i>Etude spectroscopique</i> .....	110
2.	<i>Catalyse d'oxydation avec l'ascorbate de sodium</i> .....	113
3.	<i>Etude mécanistique de la réactivité du système avec l'ascorbate de sodium</i> .....	118
a)	Suivi de la réduction de la flavine par spectroscopie UV-visible .....	119

## Sommaire

b)	Etude par spectroscopie de fluorescence .....	126
c)	Etude par spectroscopie RPE .....	127
4.	<i>Chimie radicalaire</i> .....	129
5.	<i>Conclusion</i> .....	131
II.	REGENERATION DE NADH EN COURS DE CATALYSE .....	133
1.	<i>Utilisation d'un complexe d'iridium</i> .....	133
a)	Synthèse du complexe .....	134
b)	Etude de la réduction de NAD <sup>+</sup> par spectroscopie UV-visible .....	135
c)	Catalyse d'oxydation en présence de l'enzyme artificielle et du complexe d'iridium .	136
2.	<i>Utilisation de l'alcool déshydrogénase (ADH)</i> .....	138
a)	Choix du substrat pour l'ADH et réaction d'oxydation.....	139
b)	Etude du système complet associant l'enzyme artificielle à l'ADH.....	141
3.	<i>Utilisation de la formiate déshydrogénase (FDH)</i> .....	143
a)	Etude par spectroscopie UV-visible .....	144
b)	Optimisation des conditions réactionnelles pour le système complet .....	146
4.	<i>Conclusion</i> .....	150
III.	CONCLUSION.....	151
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>153</b>
I.	CONCLUSION.....	153
II.	PERSPECTIVES.....	156
	<b>PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>158</b>
I.	MATERIELS ET METHODES .....	158
1.	<i>Spectroscopie d'absorption électronique UV-visible</i> .....	158
2.	<i>Spectrométrie de masse</i> .....	158
3.	<i>Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)</i> .....	158
4.	<i>Spectroscopie électronique de fluorescence</i> .....	159
5.	<i>Chromatographie en phase gazeuse (GC)</i> .....	159
6.	<i>Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)</i> .....	159
II.	SYNTHESE .....	159
1.	<i>Synthèse du complexe d'iridium [Cp*Ir(H-bpy)Cl]Cl</i> .....	159
2.	<i>Synthèse des authentiques</i> .....	160
3.	<i>Synthèse des polymères modifiés</i> .....	161
a)	Synthèse des amines guanidylées pour les analyses par RMN <sup>1</sup> H.....	161

## Sommaire

b) Synthèse des polymères bifonctionnalisés.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III. CARACTERISATION ET REACTIVITE DE L'ENZYME ARTIFICIELLE FMN-PEIM .....	173
1. Incorporation de la FMN dans le polymère.....	173
2. Suivi de l'oxydation du NADH par spectroscopie UV-visible .....	173
3. Suivi de l'oxydation de l'ascorbate de sodium par spectroscopie UV-visible .....	173
4. Suivi de la réduction de la FMN par NADH ou l'ascorbate par spectroscopie UV-visible..	174
5. Suivi de la réduction de la FMN par l'ascorbate de sodium par fluorescence .....	174
6. Suivi de la régénération de NADH par spectroscopie UV-visible.....	175
7. Mise en évidence du radical semiquinone par RPE .....	175
8. Mise en évidence du radical phényle par RPE.....	176
9. Mesure de la concentration en peroxyde d'hydrogène.....	176
IV. CATALYSE DES REACTIONS D'OXYDATION .....	177
1. Catalyse par le système PEIm-FMN-NADH :.....	177
2. Catalyse par le système PEIm-FMN-Ascorbate de sodium :.....	177
3. Catalyse par le système PEIm-FMN-ADH-alcool-NAD <sup>+</sup> :.....	177
4. Catalyse par le système PEIm-FMN-FDH-formiate d'ammonium-NAD <sup>+</sup> :.....	178
5. Analyse par GC des mélanges réactionnels après catalyse.....	178
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>182</b>
<b>PUBLICATION .....</b>	<b>186</b>

## Abréviations

<b>1D ou 2D :</b>	Une ou deux dimension(s)
<b>°C</b>	Celsius
<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>Ac<sub>2</sub>O :</b>	Anhydride acétique
<b>AcOEt :</b>	Acétate d'éthyle
<b>ADH :</b>	Alcool déshydrogénase
<b>AH<sub>2</sub> :</b>	Acide ascorbique
<b>AH<sup>-</sup> :</b>	Acide ascorbique (mono-anionique)
<b>AH<sup>•</sup> :</b>	Radical ascorbyle
<b>A<sup>2-</sup> :</b>	Acide ascorbique (dianionique)
<b>ANR :</b>	Agence nationale de la recherche
<b>aq</b>	Aqueuse
<b>Ar :</b>	Aromatiques
<b>atm :</b>	Atmosphérique
<b>BMIImPF<sub>6</sub> :</b>	L'hexafluorophosphate de 1-butyl-3-méthylimidazolium
<b>Cat :</b>	Catalyseur
<b>cm</b>	Centimètre
<b>BV :</b>	Baeyer-Villiger
<b>BVMO :</b>	Baeyer-Villiger mono-oxygénases
<b>CD</b>	Dichroïsme circulaire
<b>CDCl<sub>3</sub> :</b>	Chloroforme deutéré
<b>CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH :</b>	2,2,2-Trifluoroéthanol
<b>CHCl<sub>3</sub> :</b>	Chloroforme
<b>CHES :</b>	N-cyclohexyl-2-aminoéthanesulfonique
<b>CHMO :</b>	Cyclohexanone monooxygénase
<b>CH<sub>3</sub>OH :</b>	Méthanol
<b>ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> :</b>	Perchlorate
<b>CO<sub>2</sub> :</b>	Dioxyde de carbone

## *Abréviations*

<b>Cp*</b> :	Pentaméthylcyclopentadiényle
<b>cytP450</b> :	Cytochrome P450
<b>D<sub>2</sub>O</b> :	Oxyde de deutérium
<b>DCE</b> :	Dichloroéthane
<b>DCM</b> :	Dichlorométhane
<b>DFT</b> :	Density Functional Theory
<b>(DHQ)<sub>2</sub>PHAL</b> :	Hydroquinine 1,4-phthalazinediyl diether
<b>DMF</b> :	Diméthylformamide
<b>E°</b> :	Potentiel d'oxydoréduction
<b>ee</b> :	Excès énantiomérique
<b>ENH</b> :	Électrode normale à hydrogène
<b>eq.</b> :	Equivalent
<b>er</b> :	Enantiomeric ratio
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>EtO<sub>2</sub></b> :	Ether diéthylique
<b>FAD</b> :	Flavine adénine dinucléotide
<b>FDH</b> :	Formiate déshydrogénase
<b>FID</b> :	Free Induction Decay
<b>Fl<sub>ox</sub></b> :	flavine oxydée
<b>Fl<sub>red</sub></b> :	Flavine réduite
<b>Fl<sub>sq</sub></b> :	Flavine semiquinone
<b>FMN</b> :	Flavine mononucléotide
<b>Fmoc</b> :	Fluorénylméthoxycarbonyle
<b>GC</b> :	Gaz chromatography
<b>GC-MS</b> :	Gas chromatography–mass spectrometry
<b>h</b> :	Heures
<b>H<sub>2</sub></b> :	Dihydrogène
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> :	Peroxyde d'hydrogène
<b>HAPMO</b> :	4-Hydroxyacetophenone Monooxygenase
<b>HCl</b> :	Acide chloridrique
<b>HClO<sub>4</sub></b> :	Acide perchlorique

## Abréviations

<b>HCO<sub>2</sub>H :</b>	Acide formique
<b>HCO<sub>2</sub>Na :</b>	Formiate de sodium
<b>HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub> :</b>	Formiate d'ammonium
<b>HEPES :</b>	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfonique
<b>HFIP :</b>	Hexafluoroisopropanol
<b>HPLC :</b>	High pressure liquid chromatography
<b>I<sub>2</sub> :</b>	Diode
<b>iPrOH :</b>	Isopropanol
<b>K :</b>	Kelvin
<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> :</b>	Carbonate de potassium
<b>kDa :</b>	Kilodalton
<b>L :</b>	Litre
<b>M :</b>	mol.L <sup>-1</sup>
<b>m-CPBA :</b>	Acide <i>mé</i> ta-chloroperbenzoïque
<b>MeCN</b>	Acétonitrile
<b>MeI :</b>	Iodure de méthyle
<b>MeOH :</b>	Méthanol
<b>MES :</b>	Acide 2-(N-morpholino)éthane sulfonique
<b>min :</b>	Minutes
<b>MHz :</b>	Mégahertz
<b>Mn :</b>	Manganèse
<b>MO :</b>	Monooxygenase
<b>[mono] :</b>	Concentration en monomère
<b>MTBE :</b>	Méthyl tert-butyl éther
<b>mV</b>	Millivolt
<b>NaClO<sub>4</sub> :</b>	Perchlorate de sodium
<b>NAD(P)H :</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
<b>NaHCO<sub>3</sub> :</b>	Bicarbonate de sodium
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> :</b>	Dihydrogénophosphate de sodium
<b>NaIO<sub>4</sub> :</b>	Periodate de sodium
<b>NaNO<sub>2</sub> :</b>	Nitrite de sodium

## *Abréviations*

<b>NaOH :</b>	Hydroxyde de sodium
<b>NaS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> :</b>	Dithionite de sodium
<b>N(Et)<sub>3</sub> :</b>	Triéthylamine
<b>NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> :</b>	Hydrazine
<b>nm :</b>	Nanomètre
<b>NMO :</b>	Nitronate Monooxygénase
<b>O<sub>2</sub> :</b>	Dioxygène
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup> :</b>	Anion superoxyde
<b>OAc :</b>	Acétate
<b>OTf :</b>	Triflate
<b>Pd/C</b>	Palladium sur charbon
<b>PEI :</b>	Polyéthylèneimine
<b>PEI<sub>com</sub> :</b>	Polyéthylèneimine commercial
<b>PEI<sub>m</sub> :</b>	Polyéthylèneimine modifiée
<b>PEI<sub>mag</sub> :</b>	Polyéthylèneimine modifiée avec des groupements guanidinium et acide
<b>PEI<sub>mago</sub> :</b>	Polyéthylèneimine modifiée avec des groupements acide, guanidinium et octyle
<b>PEI<sub>mgn</sub> :</b>	Polyéthylèneimine modifiée avec des groupements guanidinium et naphatalène
<b>PEI<sub>mgo</sub> :</b>	Polyéthylèneimine modifiée avec des groupements guanidinium et octyle
<b>PEI<sub>ref</sub> :</b>	Polyéthylèneimine de référence
<b>pH :</b>	Potentiel hydrogène
<b>pHBH :</b>	para hydroxybenzoate hydroxylase
<b>PPh<sub>3</sub> :</b>	Triphénylphosphine
<b>ppm :</b>	Partie par million
<b>PS :</b>	Polystyrène
<b>rac :</b>	Racémique
<b>RMN :</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>RPE :</b>	Résonance paramagnétique électronique
<b>s :</b>	Seconde
<b>Sq :</b>	Semiquinone

## *Abréviations*

<b>TA :</b>	Température ambiante
<b><i>t</i>BuOH :</b>	<i>tert</i> -Butanol
<b>TFE :</b>	Trifluoroéthanol
<b>THF :</b>	Tétrahydrofurane
<b>TON :</b>	Turn over number = nombre de cycle catalytique
<b>UV :</b>	Ultraviolet
<b>Zn</b>	Zinc



## **Introduction générale**

Depuis maintenant plusieurs décennies, respecter et préserver notre environnement est au centre de la vie politique, économique et industrielle. Le concept de chimie verte a été introduit au début des années 1990, aux Etats-Unis dans le but de concevoir des produits et des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances néfastes pour notre environnement. Ainsi, la chimie contemporaine a pour préoccupation majeure la préservation de nos ressources naturelles et de notre environnement.<sup>[1]</sup>

Afin d'atteindre ce but, la nature est une source infinie d'exemples, que l'homme essaye de comprendre et de s'approprier afin de s'en inspirer, notamment pour le développement de nouveaux catalyseurs éco-compatibles, selon le concept de chimie bio-inspirée et/ou biomimétique<sup>[2]</sup>. Ce concept ne date pas d'aujourd'hui, car Léonard de Vinci en exposait déjà les bases au cours du XVI<sup>e</sup> siècle : « *Va prendre tes leçons dans la nature, c'est là qu'est notre futur* ». S'inspirer des enzymes, et plus particulièrement de leurs sites actifs, est donc devenu un objectif majeur pour le chimiste contemporain,<sup>[3]</sup> de façon à développer des catalyseurs bio-inspirés capables de travailler dans des conditions douces, à la fois en pression et en température, ainsi que dans un solvant respectueux de l'environnement tel que l'eau, tout en s'affranchissant des problèmes liés au clonage des gènes ou encore à la stabilité ou la spécificité des enzymes.

Parmi ces enzymes, les flavoenzymes sont des biocatalyseurs importants impliqués dans divers processus tels que la déshydrogénation de substrats (déshydrogénases), le transport d'électrons (Flavine réductase), la bioluminescence (luciférase), ou encore les oxydations (oxydases, hydroxylases, monooxygénases) avec notamment le cas particulier du transfert d'oxygène catalysé par les Baeyer-Villiger mono-oxygénases (BVMO) qui nous intéressent ici. Ces dernières sont capables d'activer le dioxygène et de réaliser non seulement des réactions d'oxydation telles que des réactions de Baeyer-Villiger, mais aussi des réactions de sulfoxydation ou d'époxydation<sup>[4]</sup>. Les flavoprotéines peuvent également avoir une activité réductase permettant à la flavine de fournir un flux d'électrons célibataires vers un partenaire redox (CP450)<sup>[5]</sup>.

Ainsi, lors de travaux précédents a été mis au point au sein de notre laboratoire un système capable de reproduire l'activité réductase des flavoprotéines en utilisant un système macromoléculaire composé d'un polymère hydrosoluble (polyéthylèneimine (PEI)) et d'un cofacteur redox, la FMN, capable de collecter efficacement les électrons du NADH, puis de fournir un flux mono-

électrique vers un autre cofacteur redox tel qu'une porphyrine de manganèse. Le système **PEIm-FMN**-porphyrine de Mn(III) s'est ainsi avéré capable de catalyser la réaction de sulfoxydation du thioanisole dans l'eau, à température ambiante et en utilisant le dioxygène comme source d'oxygène. Ce résultat extrêmement original constitue le premier exemple d'une hémoprotéine artificielle capable, comme les cytochromes P450, de catalyser l'oxydation de substrats en utilisant O<sub>2</sub> en milieu aqueux, dans des conditions douces de pression et de température (Figure 1).<sup>[6]</sup>

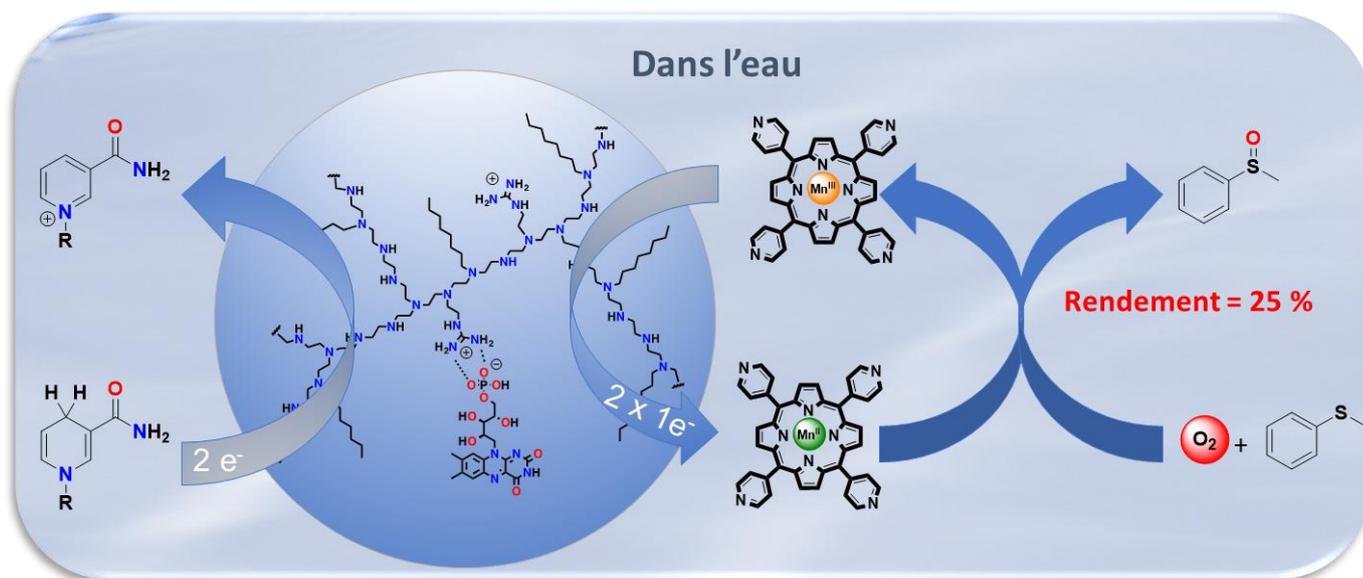


Figure 1 : Représentation schématique de l'enzyme artificielle.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la continuité de ces recherches. Ils consistent à utiliser cette même flavo-enzyme artificielle, en conditions aérobies, non plus seulement pour transférer des électrons, mais pour directement activer le dioxygène et catalyser des réactions d'oxydations de type Baeyer-Villiger, sulfoxydations ou époxydations à température ambiante et dans l'eau, comme le font les Baeyer-Villiger Monooxygénase (BVMO). Par ailleurs, nous voulons également utiliser le flux d'électron généré par l'activité réductase en conditions anaérobies, pour catalyser des réactions radicalaires dans l'eau. Ceci a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire d'Innovation Moléculaire et Applications de Mulhouse dirigé par le Professeur **Jean-Philippe GODDARD**, spécialiste de chimie radicalaire. Les résultats obtenus au cours de cette thèse seront présentés de la façon suivante :

Le manuscrit débute par une **partie bibliographique** décrivant les cofacteurs flaviniques, ainsi que deux familles de flavoenzymes : les flavines réductases et les flavines mono-oxygénases. Cette étude bibliographique est ensuite complétée par la présentation de différents systèmes bio-inspirés utilisés pour la catalyse d'oxydation en chimie organique, ainsi que les différentes flavoenzymes artificielles existantes à l'heure actuelle pour cette activité.

La **Partie 2** s'intéresse à la synthèse et à la caractérisation des différents polymères qui ont été utilisés au cours de cette étude. Ces polymères ont notamment été caractérisés par spectroscopie RMN et/ou par dichroïsme circulaire dans le cas des polymères chiraux. Les données ainsi recueillies (concentration, taux de greffage...) sont utilisées par la suite pour la mise au point de l'enzyme artificielle.

La **Partie 3** décrit les différentes étapes nécessaires pour la mise en place de la monooxygénase artificielle notamment avec des études spectroscopiques concernant l'optimisation des conditions réactionnelles (structures du polymère, tampon, pH etc...) pour le développement d'un nouveau catalyseur organique. A la suite, une étude complète de catalyse d'oxydation impliquant différentes réactivités (Baeyer-Villiger, sulfoxydation et époxydation) est également présentée.

Enfin, la **Partie 4** s'articule autour de l'évolution du système, soit par le remplacement du NADH (un réducteur coûteux) par de l'ascorbate de sodium, soit par la régénération du NADH grâce à une combinaison avec une enzyme naturelle telle que la formiate déshydrogénase.



## Chapitre 1 : Introduction Bibliographique

### I. Flavoprotéines

#### 1. Généralité sur les cofacteurs flaviniques

Les flavines sont des molécules organiques dérivées de la riboflavine, plus connues sous le nom de Vitamine B2. Il existe deux principaux cofacteurs flaviniques, la FMN (flavine mononucléotide) et la FAD (flavine adénine dinucléotide) (Figure 2)<sup>[7]</sup>. Les flavines sont constituées d'un cycle isoalloxazine, qui leur confère leurs propriétés spectrales, sur lequel sont liés des groupements greffés d'une partie ribityle et adénosine en position N<sub>10</sub>, qui permettent l'interaction spécifique de ces flavines avec leurs protéines hôtes.<sup>[8]</sup>

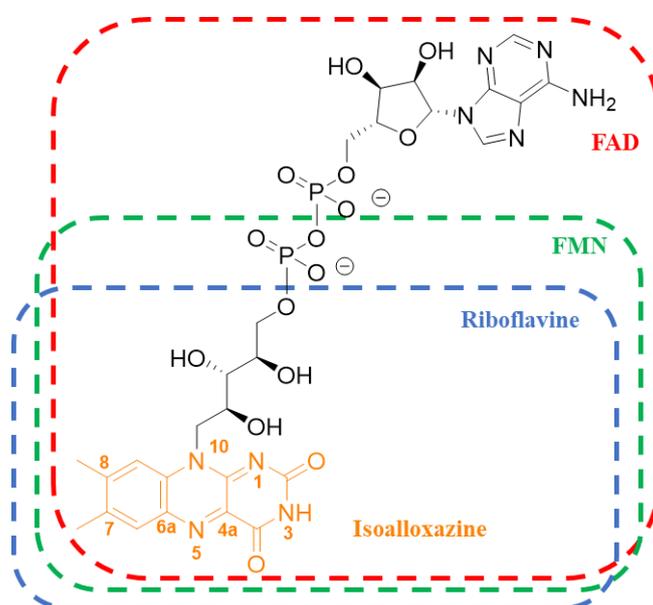


Figure 2 : Structures de la Riboflavine, de la FMN et la FAD à l'état oxydé. <sup>[7]</sup>

#### a) Propriétés redox

Comme dit précédemment, le noyau isoalloxazine est responsable de la quasi-totalité des propriétés des flavines. Ainsi, ce noyau peut être réduit à 1 ou à 2 électrons, formant respectivement une flavine semiquinone ou une flavine réduite. De plus, chacune de ces espèces peut exister sous trois formes différentes : cationique, neutre et anionique. Cependant, il est à noter, que seules cinq de ces neuf espèces existent en conditions physiologiques,<sup>[9]</sup> la flavoquinone neutre, ainsi que les flavosemiquinones et hydroquinones sous leurs formes anioniques et neutres.

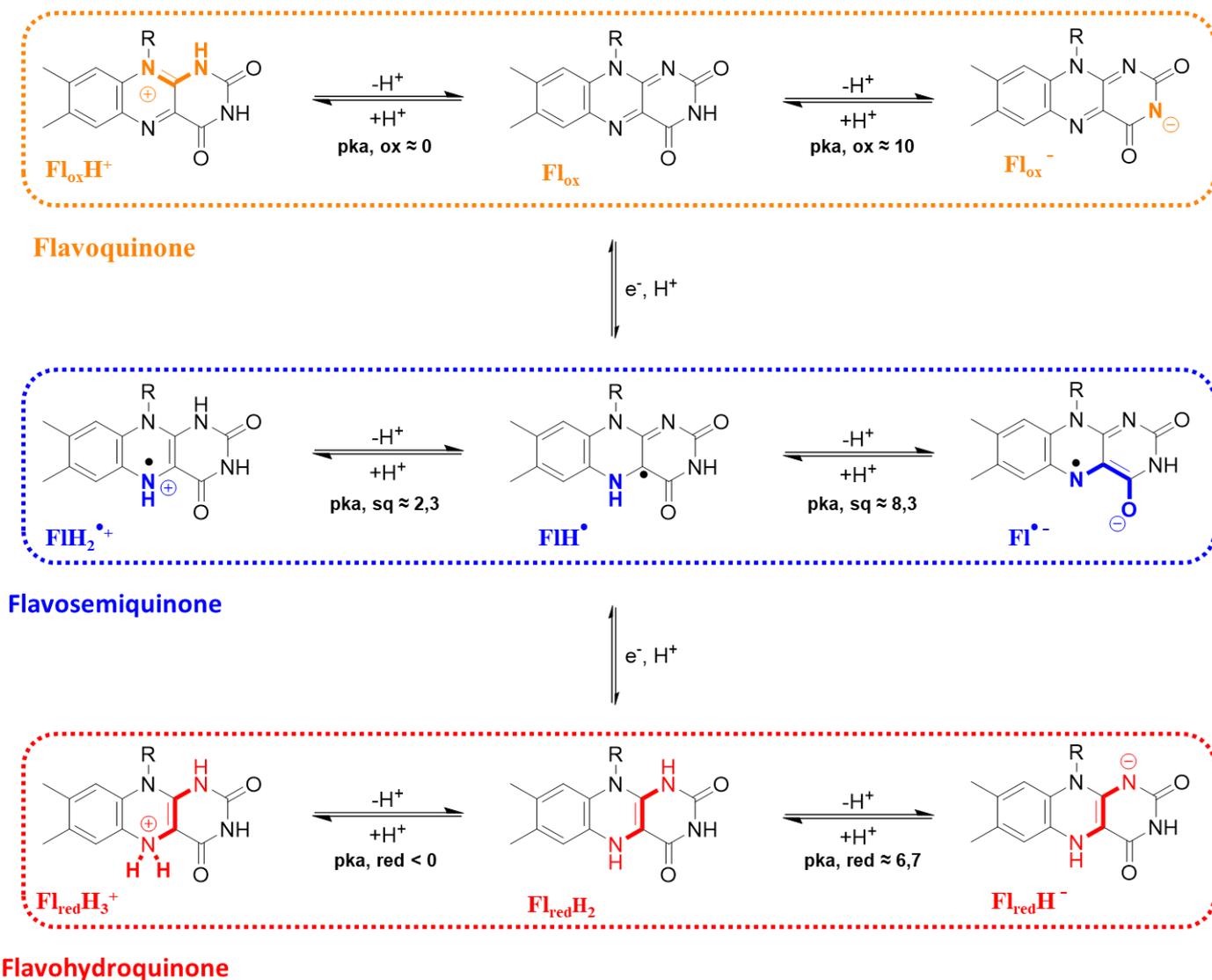


Figure 3 : Etats d'ionisation et couples redox des flavines.<sup>[10]</sup>

Tableau 1 : Potentiels redox mesurés pour les différents couples redox de la flavine.<sup>[11,12]</sup>

Couple redox	Potentiel redox standard vs NHE (pH = 7,0)
FLH <sup>•</sup> /Fl <sub>red</sub>	-101 mV
Fl <sub>ox</sub> /Fl <sub>red</sub>	-207 mV
Fl <sub>ox</sub> /FlH <sup>•</sup>	-303 mV

Le noyau isoalloxazine des flavines oxydées (Fl<sub>ox</sub>) peut donc recueillir 1 ou 2 électrons et les redistribuer soit par paire, soit séquentiellement, électron par électron à un partenaire redox. Avec des valeurs négatives pour les potentiels redox des différents couples, les flavines sont ainsi de bons

réducteurs. Concernant les différents états redox des flavines, en condition anaérobie, une flavine libre en solution réduite à un électron devrait former une flavine semiquinone (Figure 4).

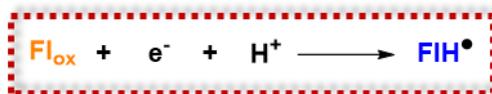


Figure 4 : Réduction à un électron de la flavine oxydée.

Or, dans les faits, seulement une faible proportion de  $\text{FlH}^{\bullet}$  est observée en solution. Le rendement en semiquinone étant estimé à 2% de la totalité de flavine présente en solution. Ceci peut s'expliquer par la dismutation de la flavine semiquinone en flavine oxydée et flavine réduite (Figure 5).<sup>[9]</sup>

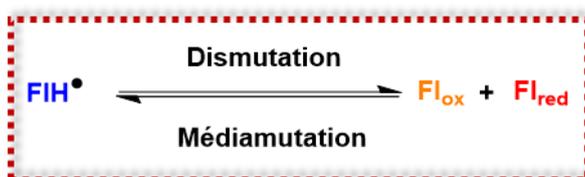


Figure 5 : Réaction de dismutation et de médiamutation de la flavine semiquinone

Enfin, le noyau isoalloxazine, et plus particulièrement le cycle phényl (C6-C9), ainsi que la présence de doubles liaisons conjuguées au sein de ce cycle, procurent des propriétés spectrales intéressantes aux flavines.<sup>[13]</sup>

### **b) Propriétés spectrales**

Comme indiqué par leur nom, qui provient du latin *flavus*, les flavines sont généralement de couleur jaune. Cette couleur jaune caractéristique vient de la transition la plus basse en énergie, centrée autour de 450 nm. La molécule présente quatre transitions électroniques importantes dans la région spectral UV/visible. La transition de plus basse énergie (450 nm) implique un transfert de charge ( $e^{-}$ ) entre le cycle xylène riche en électron et le cycle pyrimidine appauvri. La réduction de la flavine par un électron génère la flavine semiquinone d'une couleur bleue caractéristique dans sa forme neutre en raison de l'apparition d'un maximum d'absorption entre 580 nm et 615 nm ( $\epsilon = 5000$

$\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Pour la forme anionique de la semiquinone, la bande à 615 nm disparaît au profit d'une bande à 350 nm de forte intensité avec conservation d'une bande à 500 nm donnant ainsi une couleur rouge. L'addition d'un second électron conduit à la flavine complètement réduite. Dans cet état, la flavine est essentiellement incolore en solution, en raison de la perte de la bande de haute intensité à 450 nm de la forme oxydée. Cependant, la flavine réduite montre une couleur rouge à forte concentration provenant de la large bande de faible intensité aux alentours de 500 nm. Il est aussi important de noter que les spectres d'absorption des flavines (principalement sous forme semiquinone) peuvent différer d'une enzyme à une autre, en raison de l'environnement protéique autour de la flavine (Figure 6).<sup>[8,14]</sup>

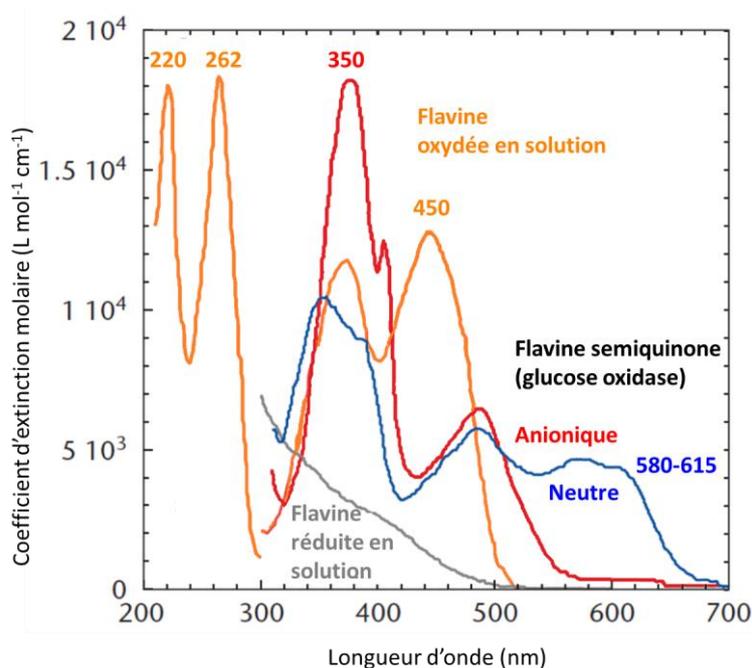


Figure 6 : Spectre d'absorption électronique des différents noyaux flaviniques en solution pour la flavine oxydée (—) et réduite (—) et dans la glucose oxidase pour les flavines semiquinones anionique (—) et neutre (—).<sup>[8]</sup>

Les propriétés de fluorescence des flavines proviennent également de leurs noyaux isoalloxazines. Ainsi, lumiflavine, riboflavine, FMN et FAD ont approximativement le même rendement quantique en solution aqueuse (Tableau 2). Les formes oxydées des flavines ont un maximum d'absorption à une longueur d'onde d'émission d'environ 520-530 nm.<sup>[15]</sup>

Tableau 2 : Rendement quantique des différents cofacteurs flaviniques.<sup>[16]</sup>

Rendement quantique mesuré avec une longueur d'onde d'émission de 545 nm				
Solvants	Lumiflavine	Riboflavine	FMN	FAD
H <sub>2</sub> O	0,29	0,26	0,25	0,04
Ethanol	0,45	0,32	0,27	0,20

La diminution du rendement quantique de la FAD en solution aqueuse est expliquée par une interaction intramoléculaire de type « $\pi$ -stacking » entre le noyau isoalloxazine et le cycle adénine, ce qui entraîne un « quenching » de la fluorescence. En ce qui concerne les flavines semiquinones, elles possèdent un maximum de fluorescence à 630 nm lors d'une excitation à 575 nm, mais avec une intensité 10 fois moins intense que pour la flavine oxydée libre en solution (Tableau 3).<sup>[17]</sup>

Tableau 3 : Propriétés de fluorescence de la FMN en solution dans une NMO (Nitronate Monoxygénase) à 15 °C.

	pH	Extinction (nm)	Emission (nm)	Intensité relative
FMN oxydée libre	5	379	531	2400
	10	378	531	920
FMN oxydée dans PaNMO	5	380	530	20
	10	373	523	2
FMNsq neutre dans PaNMO	5	574	628	280

Condition anaérobie dans 20 mM pipérazine, 0,1 M NaCl avec 20% de glycérol

La flavine semiquinone sous forme anionique ne présente en revanche aucune fluorescence quelle que soit la longueur d'onde à laquelle la flavine est excitée (370 , 402 ou 485 nm). La seule étude rapportée concernant les propriétés de fluorescence d'une flavine semiquinone anionique liée à une protéine montre une fluorescence à 525 nm après excitation à 450 nm d'une FAD dans un cryptochrome d'insecte de Type 1.<sup>[18,19]</sup> Cependant, comme décrit plus tôt, la flavine oxydée fluoresce à 530 nm lors d'une excitation à 450 nm, ce qui suggère que de faibles traces de flavine oxydée pourraient avoir été présentes dans l'échantillon de cryptochrome (Figure 7).<sup>[20,21]</sup> En parallèle, un environnement protéique plus dense entoure la flavine semiquinone anionique dans les NMO (Nitronate monoxygénase) que dans les cryptochromes de type 1, ce qui pourrait expliquer l'absence d'émission de fluorescence dans les NMO.<sup>[22]</sup>

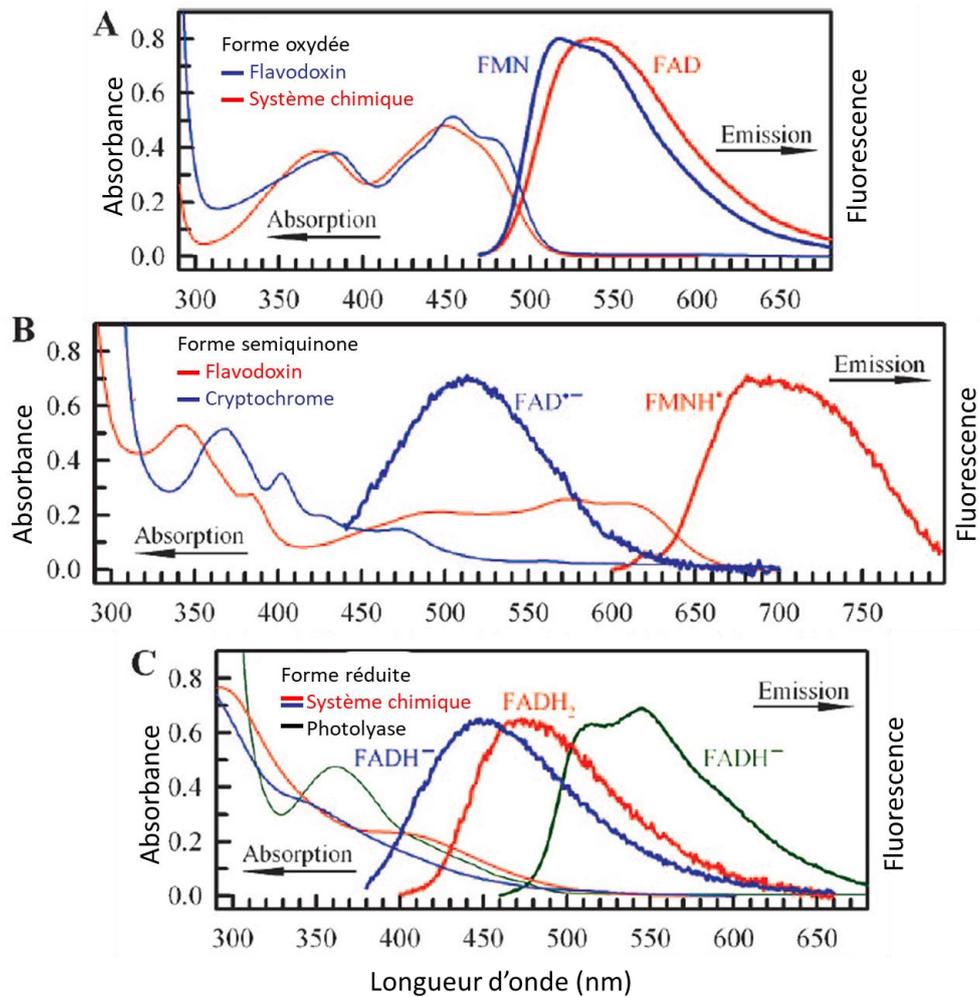


Figure 7 : Spectres d'absorption (trait fin) et d'émission (trait gras) de différents cofacteurs flaviniques, (A) états oxydés, (B) semiquinone et (C) réduit. Longueur d'excitation, 400 nm pour la forme oxydée, 420 nm pour FAD<sup>•-</sup>, 580 pour FMNH<sup>•-</sup> et 360 nm pour les formes réduites.<sup>[23]</sup>

**c) Réactivité des flavines libres en solution avec le dioxygène.**

Une fois réduites, les flavines sont extrêmement réactives vis-à-vis de l'oxygène. Elles sont capables de réduire O<sub>2</sub> à 1 ou 2 électrons produisant ainsi l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ou le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 8).<sup>[24,25]</sup>

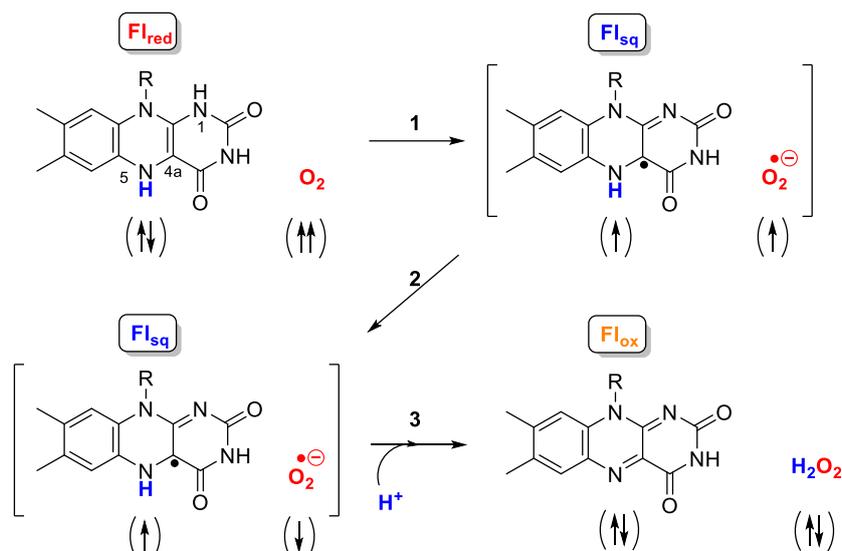


Figure 8 : Mécanisme proposé pour l'oxydation de la flavine hydroquinone par  $\text{O}_2$  en solution (Après le transfert initial d'un électron de la flavine réduite vers le dioxygène générant ainsi l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  et la flavine semiquinone (1), l'inversion de spin de la paire de radicaux résultante (2) permet ensuite leur interaction conduisant à la flavine oxydée et au peroxyde d'hydrogène (3)).

L'oxydation de la flavine libre s'effectue à une vitesse estimée de  $250 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , entraînant ainsi l'accumulation d'espèces réactives et plus particulièrement, de l'anion superoxyde et la de flavine semiquinone. Différentes études proposent un transfert d'électron initial de la flavine à l'oxygène triplet. Après inversion de spin, l'intermédiaire peroxyflavine instable dans l'eau, se dissocie via une coupure hétérolytique en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et flavine oxydée.<sup>[26]</sup> Plus récemment, des études spectroscopiques ont permis de mettre en évidence la formation d'un intermédiaire avec des propriétés d'absorption électronique similaires à la flavine semiquinone anionique dans une glucolate oxidase humaine.<sup>[27]</sup>

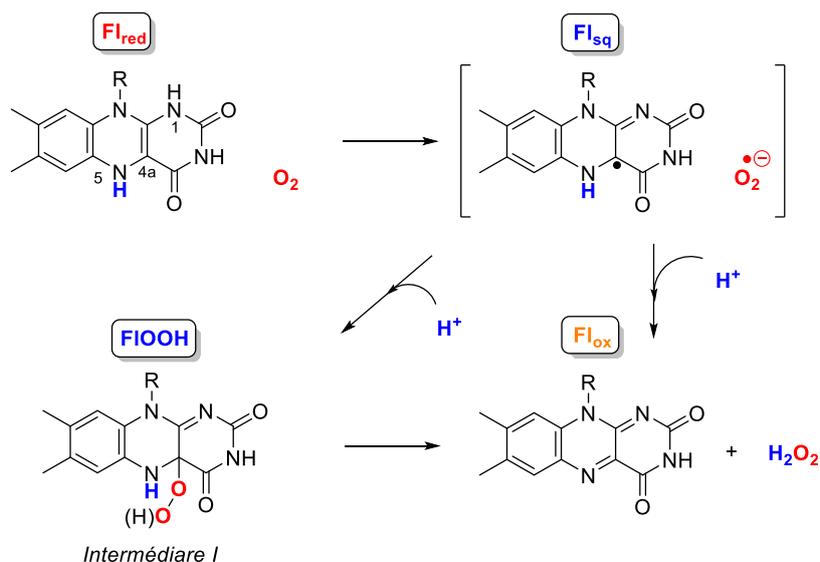


Figure 9 : Réaction entre une flavine libre réduite et le dioxygène conduisant à la formation d'un intermédiaire de type hydroperoxyflavine.

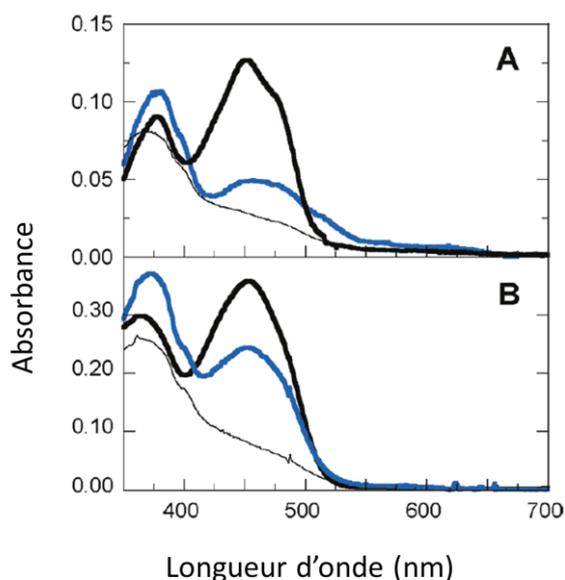


Figure 10 : (A) Réaction d'oxydation de la flavine au sein d'une glycolate oxydase dans la pipérazine 100 mM à 30 °C : enzyme réduite (trait noir fin), enzyme oxydée (trait noir gras) et l'intermédiaire I enregistré 2,2 ms après le début de la réaction (trait bleu). (B) Réduction anaérobie de la glycolate oxydase oxydée par le système xanthine / xanthine oxydase dans 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0) : enzyme oxydée (trait noir gras), enzyme réduite (trait noire fin) et semiquinone anionique (trait bleu).<sup>[27]</sup>

Concernant les potentiels redox des différents couples impliqués, il est intéressant de noter que les potentiels liés aux processus à deux électrons sont très différents des potentiels liés aux processus mono-électroniques. En effet, le potentiel redox du couple O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est de + 281 mV à pH

= 7,0, tandis que les couples  $O_2/O_2^{\bullet-}$  et  $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$  présentent des potentiels estimés à -330 et +890 mV. En comparaison, le potentiel médian du couple  $Fl_{ox}/Fl_{red}$  est de -207 mV à pH = 7,0. Le potentiel redox du couple  $O_2/O_2^{\bullet-}$  est lui bien inférieur au couple  $Fl_{ox}/Fl_{red}$  et également souvent inférieur au couple  $Fl_{red}/Fl^*$ , qui est évalué à -101 mV pour les flavines libres. Pour résumer, les flavines réduites en solution sont capables de réduire efficacement le dioxygène, produisant ainsi l'anion superoxyde et la flavine semiquinone. Mais cette réactivité est complètement modifiée lorsque la flavine est incorporée dans son enzyme, ce qui fait varier le potentiel sur une large gamme comprise entre - 400 à + 150 mV.<sup>[12]</sup>

## 2. Flavines Monooxygénases

### a) Généralités

Il existe 3 groupes bien définis de flavoprotéines classées en fonction de leur vitesse de réaction avec le dioxygène et de la nature du produit formé. Le 1<sup>er</sup> groupe est celui des flavines déshydrogénases / réductases, qui ne réagissent pas ou très peu avec le dioxygène. Les flavoprotéines déshydrogénases préfèrent transférer leurs électrons vers un autre accepteur présent dans le milieu plutôt qu'au dioxygène. Par exemple, la D-arginine déshydrogénase de *Pseudomonas aeruginosa* est complètement insensible au dioxygène.<sup>[28]</sup> Ces enzymes seront présentées plus en détail dans une partie ultérieure du manuscrit. Les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> groupes d'enzymes, les oxydases et les monooxygénases réagissent plus rapidement avec le dioxygène. En ce qui concerne les oxydases à flavines, elles utilisent efficacement le dioxygène comme accepteur d'électron pour donner majoritairement  $H_2O_2$ ; alors que les flavoenzymes de type monooxygénases activent le dioxygène par une réduction à deux électrons pour former une espèce intermédiaire de type C(4a) (hydro)peroxyflavine capable d'insérer un atome d'oxygène dans les substrats. De plus, l'incorporation des cofacteurs flaviniques au sein des protéines, améliore considérablement leur réactivité vis-à-vis de  $O_2$ , avec des valeurs de constantes de vitesse  $k_{cat} / K_M$  pouvant aller jusqu'à  $10^6$ - $10^7 M^{-1} s^{-1}$ .<sup>[29,30]</sup>

b) Les monoxygénases

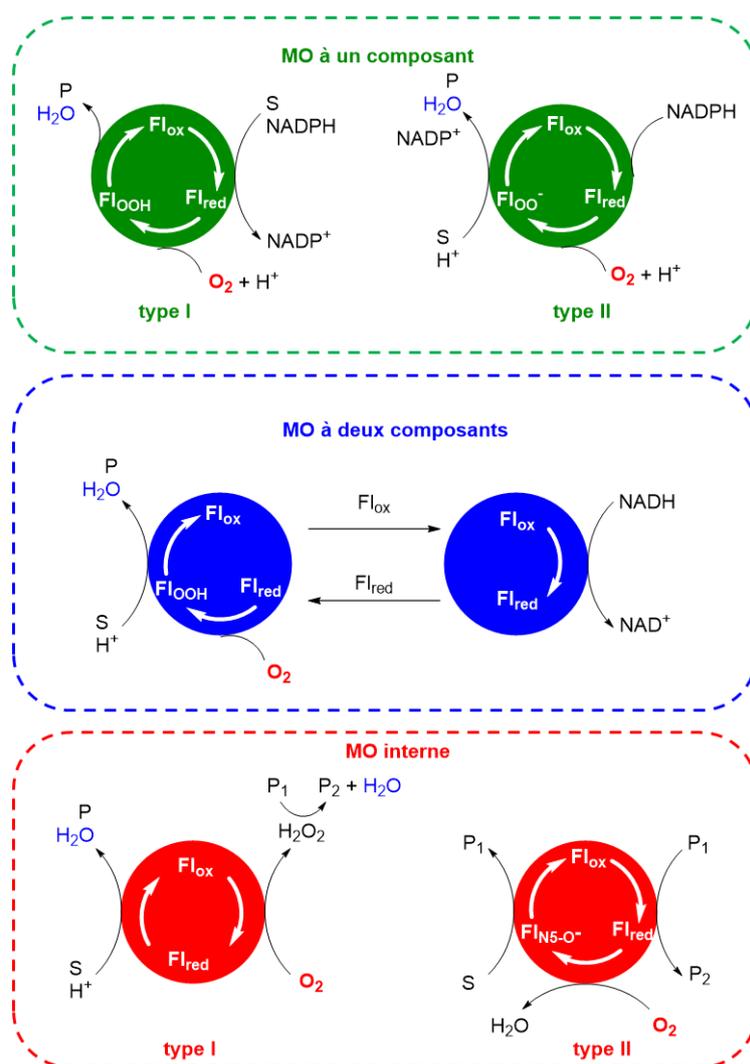


Figure 11 : Différentes catégories de Flavines monoxygénases (MO).

Les monoxygénases à flavine utilisent le dioxygène pour effectuer l'incorporation d'un atome d'oxygène dans un substrat organique par activation réductrice du dioxygène et libération d'une molécule d'eau. Elles sont également classées en 3 catégories en fonction de leurs méthodes pour réduire le cofacteur flavinique (FMN ou FAD)<sup>[7]</sup> : les monoxygénases (MO) à un composant (groupe A et B), à deux composants (groupes C-F) et internes (groupes G et H). Les monoxygénases à un composant utilisent la FAD en tant que groupement prosthétique, qui est fortement ancré dans le site actif de la protéine durant tout le cycle catalytique. L'oxygène moléculaire réagit avec la flavine réduite pour former l'intermédiaire hydroperoxo. Les monoxygénases de classe A comportent un motif de liaison à un dinucléotide (appelé pli Rossman) qui va lier FAD, alors que les monoxygénases de classe B possèdent deux plis Rossman : un liant la FAD et l'autre NAD(P)H. Ces enzymes utilisent

NAD(P)H en tant que donneur d'hydrure. Cependant NAD(P)<sup>+</sup> est soit libéré immédiatement après réduction des flavines dans le cas des enzymes de classe A, soit maintenu dans le cycle catalytique pour les monooxygénase de classe B. Concernant les MO à deux composants, il y a nécessité d'utiliser deux enzymes distinctes pour pouvoir réaliser la réaction globale, une partie réductase dépendante du NAD(P)H qui permet de délivrer une FMN ou une FAD réduite à la seconde enzyme, où se produit la réaction avec le dioxygène et un substrat organique. Des travaux récents indiquent que dans la plupart des cas, la flavine réduite est transférée de la réductase à la monooxygénase par un mécanisme de diffusion libre<sup>[31]</sup>. Or, la vitesse de diffusion de la flavine réduite, ainsi que sa fixation à la seconde enzyme doivent être supérieures à la vitesse de réaction de la flavine réduite libre avec l'oxygène moléculaire, afin de réduire au maximum les pertes en flavine réduite et de minimiser également la formation de peroxyde d'hydrogène. Ainsi, la composante réductase présente habituellement une valeur de  $K_D$  plus faible pour la flavine oxydée que pour la flavine réduite et l'inverse s'applique à la composante monooxygénase. Enfin, pour les MO interne, le cofacteur flavinique est réduit par le substrat et non par un donneur d'électrons (NADH ou NADPH) comme précédemment.

Tableau 4 : Les différentes classes de flavines Monooxygénases<sup>[32]</sup>

Classe	Cofacteur	Donneur d'électron	Réactions
A	FAD	NAD(P)H	Hydroxylation Sulfoxydation
B	FAD	NAD(P)H	Oxydation de BV Oxygénation d'hétéroatome Décarboxylation oxydante
C	FMN	FMNH <sub>2</sub>	Emission de lumière Oxydation de BV Désulfurisation, sulfoxydation
D	FAD / FMN	FADH <sub>2</sub> / FMNH <sub>2</sub>	Hydroxylation N-Hydroxylation
E	FAD	FADH <sub>2</sub>	Epoxydation
F	FAD	FADH <sub>2</sub>	Halogénéation
G	FAD	Substrat	Décarboxylation oxydante
H	FMN	Substrat	Décarboxylation oxydante Dénitration oxydante

Dans les monoxygénases, la réduction du cofacteur flavinique permet de former la flavine réduite qui réagit avec l'oxygène moléculaire, donnant généralement un intermédiaire de type C(4a)-(hydro)peroxyflavine, formé avec des constantes de vitesse de second ordre de  $10^4$  à  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . C'est l'unique étape qui est dépendante de la concentration en dioxygène. L'intermédiaire (hydro)peroxyflavinique est responsable de l'insertion d'un atome d'oxygène dans un substrat, produisant un second intermédiaire de type C(4a)-hydroxyflavine (Figure 12). La régénération de la flavine oxydée a lieu après élimination du deuxième atome d'oxygène sous la forme d'une molécule d'eau. En l'absence d'un substrat accepteur d'oxygène, l'intermédiaire (hydro)peroxyflavinique va libérer du peroxyde d'hydrogène à la place de l'eau. Ce processus est appelé « *uncoupling* ». Le C(4a)-(hydro)peroxyflavine est capable d'exécuter des réactions chimiques très variées, notamment des hydroxylations, des réactions d'oxydation de type Baeyer-Villiger, des sulfoxydations, des époxydations, des halogénations ou encore des décarboxylations oxydatives (Tableau 4).

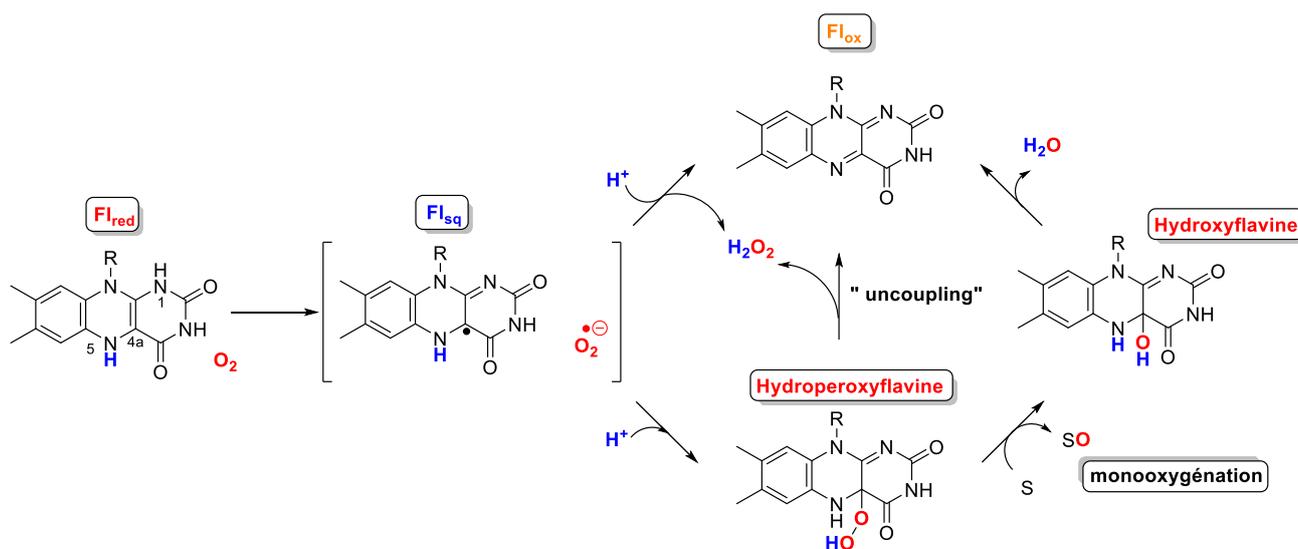


Figure 12 : Mécanisme général d'activation du dioxygène par les flavines réduites au sein des flavines monoxygénases.

### c) La para hydroxybenzoate hydroxylase (pHBH).

La *para* hydroxybenzoate hydroxylase (pHBH) est considérée comme l'exemple type des monoxygénases de classe A. Elle a ainsi été largement étudiée dans la littérature avec une description très détaillée de son mécanisme, notamment à l'aide de plusieurs techniques spectroscopiques (UV-visible, Diffraction des rayons X, etc...). [33,34]

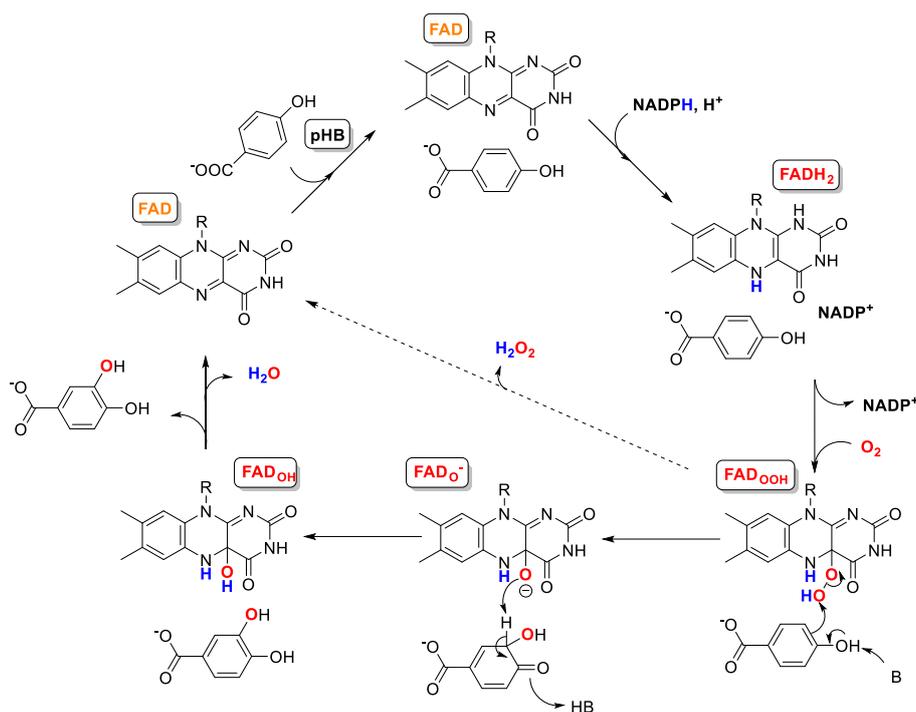


Figure 13 : Mécanisme de la pHBH.<sup>[34]</sup>

Au cours du cycle catalytique, l'acide para-hydroxybenzoïque (pHB) se lie tout d'abord à la protéine, permettant également au NADPH de se lier, car l'enzyme requiert la formation d'un complexe ternaire entre FAD<sub>ox</sub> liée à l'enzyme, le substrat et aussi le NADPH qui pourra alors transférer un hydrure. La réduction de la FAD entraîne alors un changement de conformation de la protéine libérant ainsi le NADP<sup>+</sup>. La réaction suivante entre la flavine réduite et l'oxygène moléculaire conduit à la formation de l'espèce active : hydroperoxyflavine (FAD<sub>OOH</sub>). L'oxygène terminal de cet intermédiaire subit alors une attaque nucléophile pour être transféré sur le substrat formant une diénone qui se réorganise rapidement afin de retrouver son aromaticité, en transférant un proton à la flavine et donnant naissance à un second intermédiaire : l'hydroxyflavine. Après avoir libéré le produit d'oxydation, l'hydroxyflavine subit enfin une déshydratation pour redonner la FAD<sub>ox</sub> tout en relarguant une molécule d'eau. Un nouveau cycle catalytique peut alors débuter.

d) Baeyer-Villiger Monoxygénases

i. Réaction de Baeyer-Villiger

C'est en 1899 qu'Adolf von Baeyer (prix Nobel 1905) et son élève Victor Villiger, mettent au point une nouvelle méthode permettant la conversion de cétone cyclique comme la menthone en lactone correspondante par l'utilisation d'acide monopersulfurique (également connu sous le nom d'acide de Caro), un nouvel oxydant (Figure 14).<sup>[35]</sup>

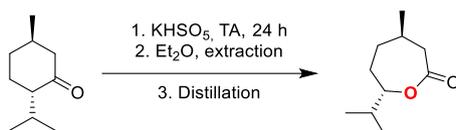


Figure 14 : Première réaction de Baeyer-Villiger

Ainsi, la transformation de cétone ou de cétone cyclique en ester ou lactone avec des peracides est devenue la réaction de Baeyer-Villiger qui constitue, aujourd'hui, l'une des réactions les plus utilisées en chimie de synthèse.<sup>[36]</sup> Il a cependant fallu attendre 50 ans pour que Criegee propose un mécanisme en 2 étapes, qui est encore aujourd'hui accepté par la communauté scientifique.<sup>[37]</sup>

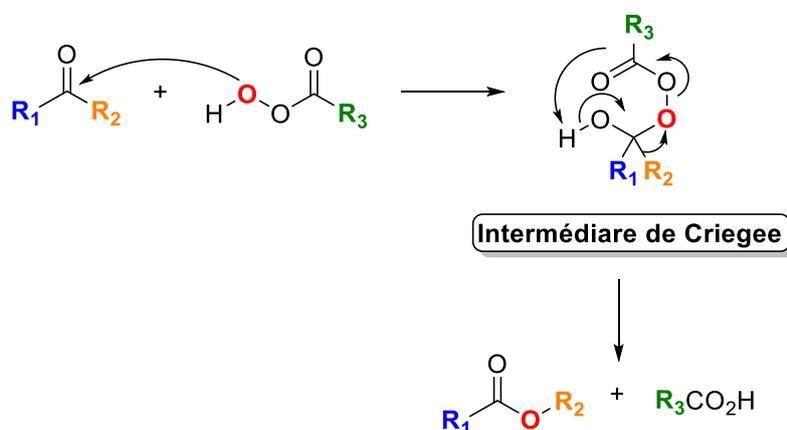


Figure 15 : Mécanisme proposé par Criegee pour la réaction de Baeyer-Villiger.

Le mécanisme proposé par Criegee commence par l'attaque nucléophile du peracide sur le carbonyle, conduisant à un intermédiaire tétraédrique plus communément appelé intermédiaire de Criegee. La seconde étape voit le réarrangement de cet intermédiaire de Criegee, par une migration concertée de l'un des atomes de carbone adjacents vers l'oxygène, entraînant également la libération

de l'anion carboxylate. Le réarrangement est l'étape déterminante de la réaction et se réalise toujours avec conservation de la stéréochimie du groupement migrant. La migration du groupement avec le carbone le plus substitué ou le plus nucléophile sera toujours préférentielle lors de la réaction. De plus, la liaison qui va subir la migration doit impérativement se situer de façon antipériplanaire par rapport à la liaison oxygène-oxygène et à un des doublets libres de l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle (Figure 16).

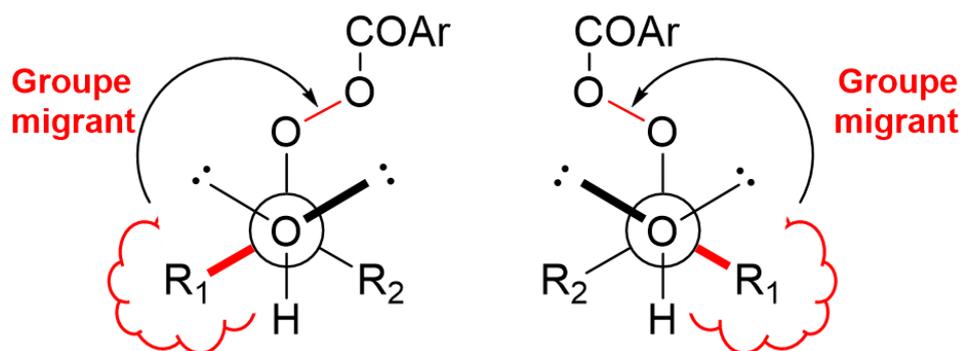


Figure 16 : Représentation de Newman de l'intermédiaire de Criegee.

Cette réaction comprend d'autres avantages, comme une large gamme de substrats pouvant être oxydés et une bonne tolérance au groupement fonctionnel présent sur la molécule à oxyder. Malgré tous ces avantages, la réaction de Baeyer-Villiger manque de chimio, de stéréo et d'énantiosélectivité. De plus, l'utilisation de peracide en quantité stœchiométrique engendre une quantité importante de produit secondaire (1 équivalent d'acide carboxylique) qui doit être éliminé ou recyclé en fin de réaction, ce qui est coûteux et très peu écoresponsable. Les oxydants utilisés (*m*CPBA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ...) ont également un certain coût et présentent des risques d'explosion non négligeables, rendant leur utilisation à grande échelle délicate. Les recherches pour améliorer et rendre la réaction de Baeyer-Villiger plus sûre, efficace et sélective constituent aujourd'hui un réel défi et les réactions enzymatiques en sont une alternative sérieuse.

## ii. Les Baeyer-Villiger Monooxygénases

C'est au début des années 1950 que les premiers indices sur l'existence d'une réaction de Baeyer-Villiger biologique ont été découverts grâce à une série d'études sur les stéroïdes d'origine microbienne.<sup>[38]</sup> Mais, ce sont les travaux sur la conversion de la progestérone en testolactone (70%

de rendement) à l'aide de champignons tel que *Penicillium Chrysogenum* qui ont permis de fournir la première preuve concrète de la formation de lactone.<sup>[39]</sup>

Les Baeyer-Villiger Monoxygénases (BVMO) peuvent être séparées en 2 catégories : les BVMO de types I, qui sont FAD et NADPH dépendantes, et les BVMO de type II, qui elles sont NADH et FMN dépendantes.<sup>[40]</sup> Autre point important, chaque type de BVMO appartient à une classe différente de flavoprotéines monoxygénases. Ainsi, celles de type I font partie de la classe B au même titre que les NMOs (N-hydroxylmonoxygénase) alors que les types II sont quant à elle de classe C.

Le mécanisme des BVMOs connu aujourd'hui a été proposé par Walsh en 1982 et est inspiré de celui de CHMO d'*A.calcoaceticus*.<sup>[41]</sup> Il a ensuite été confirmé et affiné en 2001 à l'aide d'études cinétiques et spectroscopiques.<sup>[42]</sup>

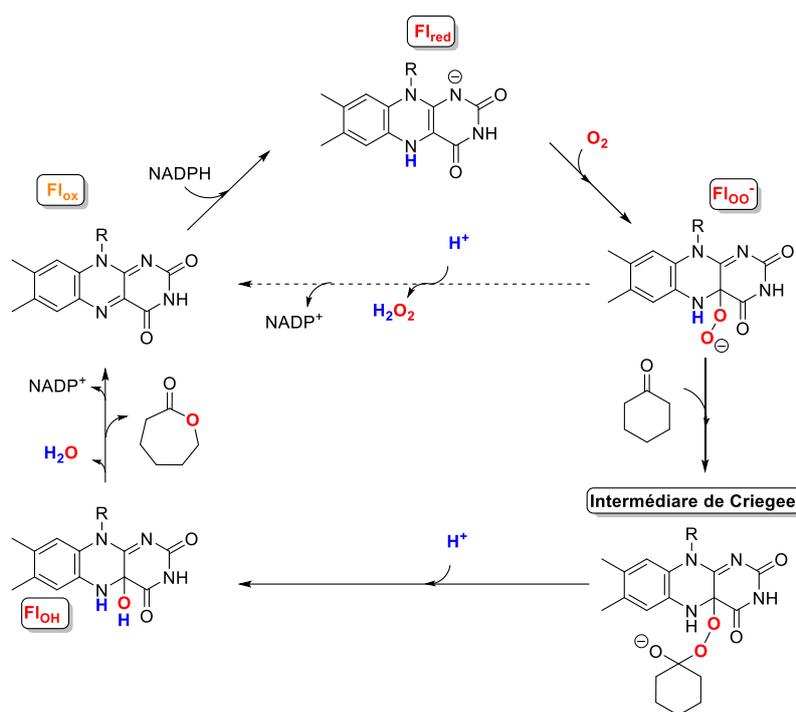


Figure 17 : Mécanisme de la réaction de Baeyer-Villiger enzymatique.

Au sein de ces BVMOs, la flavine est ancrée dans l'enzyme par une ou des liaisons non covalentes. Le NADPH interagit lui aussi avec la protéine pour réduire la flavine et le complexe enzyme-FAD<sub>red</sub>-NADP<sup>+</sup> qui réagit avec une molécule de dioxygène pour former la peroxyflavine. C'est cet intermédiaire extrêmement réactif qui va jouer le rôle de nucléophile et remplacer les peracides.

En présence d'une cétone ou d'une cétone cyclique, ce nucléophile attaque le groupement carbonyle pour conduire à la formation de l'intermédiaire de Criegee qui se réarrange en lactone et en hydroxyflavine comme décrit précédemment. Enfin, une molécule d'eau est libérée pour reformer la flavine oxydée et laisser place à un nouveau cycle catalytique.

### e) Flavin N(5)-Oxide

Récemment, les groupes de Moore et de Palfey ont réussi à mettre en évidence un nouvel intermédiaire grâce à l'enzyme EncM, dont le mécanisme n'implique pas la formation de l'intermédiaire (hydro)-peroxyflavine habituel. En effet, le mécanisme catalytique de EncM implique la formation et l'utilisation d'une autre intermédiaire actif, la flavine-N5-oxide.<sup>[43]</sup> Des études de spectroscopie d'absorbance électronique (UV-vis) et de spectrométrie de masse couplée à des marquages à l'oxygène 18 ont permis de mettre en évidence avec précision que cet intermédiaire, la flavine N(5)-oxide, participe à la réaction d'oxydation à la place de l'hydroperoxyflavine. De plus, lorsque la flavine N(5)-oxide est ancrée dans EncM, sa stabilité est remarquable (environ 7 jours, à 4 °C).

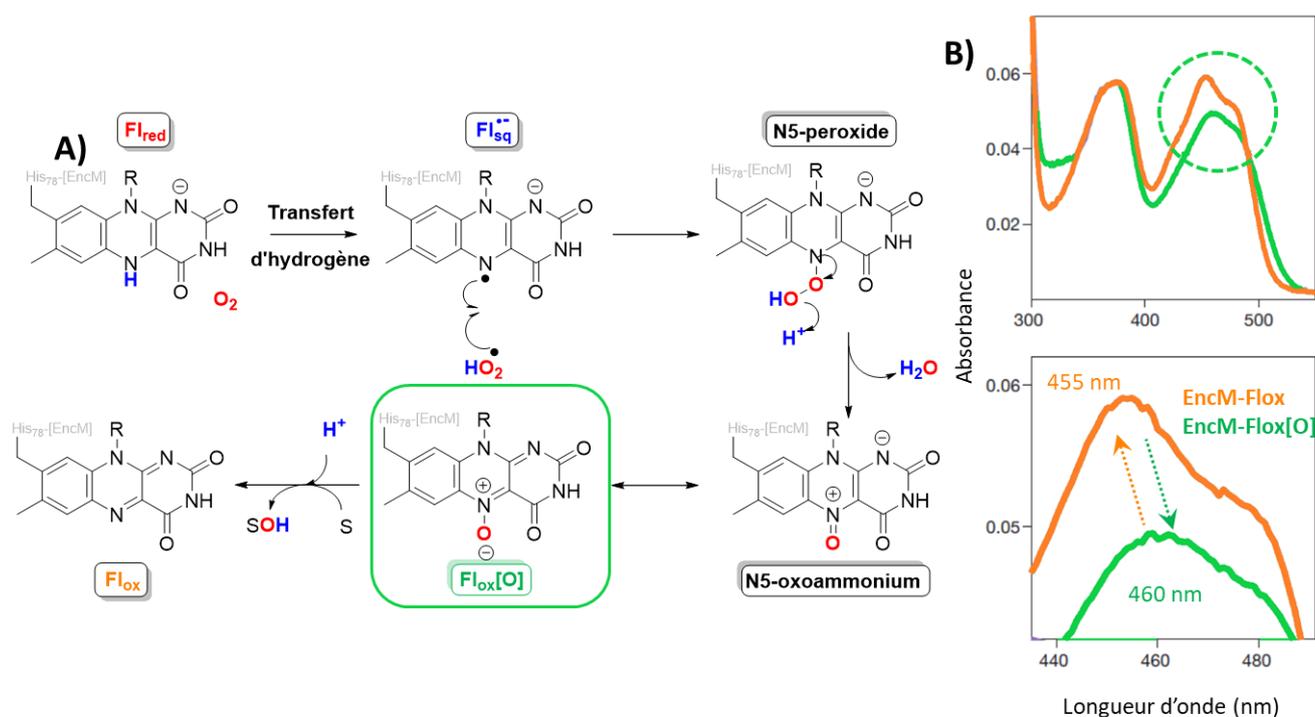


Figure 18 : A) Mécanisme possible pour la formation de la flavine N5-oxide. B) Spectre UV de EncM-Fl<sub>ox</sub>[O] (—) et EncM-Fl<sub>ox</sub> (—). Coefficient absorption molaire pour EncM-Fl<sub>ox</sub>  $\epsilon = 11,900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  et pour EncM-Fl<sub>ox</sub>[O]  $\epsilon = 9,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .<sup>[44]</sup>

En ce qui concerne le spectre d'absorption de cette flavine, qu'elle soit à l'intérieur de la protéine ou libre en solution, elle possède un coefficient d'extinction molaire plus faible que la flavine oxydée dans la région avoisinant les 450 nm. Son maximum d'absorption est lui aussi modifié avec un décalage bathochromique d'une dizaine de nanomètres (460 nm). Ces propriétés spectrales contrastent avec l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine observé précédemment (Figure 10), qui possède un maximum autour de 380 nm mais avec une absorbance beaucoup plus faible dans la région de 450 nm.

La FAD sous forme réduite liée à l'enzyme EncM transfère tout d'abord un atome d'hydrogène de l'atome d'azote N(5) sur l'oxygène moléculaire pour donner le superoxyde protoné et la flavine semiquinone anionique. Ce processus peut se réaliser en deux étapes distinctes avec tout d'abord un transfert d'électron suivi du transfert de proton. Le peroxyde en N(5) de la flavine va pouvoir se former par réaction entre  $\text{HO}_2^\bullet$  et la semiquinone. La forte densité de spin autour de l'azote favorise alors la formation du produit d'addition sur N(5) plutôt que sur C(4a). Vient ensuite l'élimination d'une molécule d'eau avec la formation de N(5)-oxoammonium. La dernière étape permet de reformer la flavine oxydée tout en oxydant un substrat.

Les monooxygénases sont capables de contrôler l'activation du dioxygène et ainsi de moduler la réactivité du cofacteur flavinique. Ce dernier sera plutôt nucléophile pour les peroxydes ou les N-oxydes ou plutôt électrophile pour les hydroperoxydes. Cette modulation est due à l'environnement protéique, qui permet de stabiliser soit l'intermédiaire peroxyflavine soit l'intermédiaire hydroperoxyflavine (Figure 19).

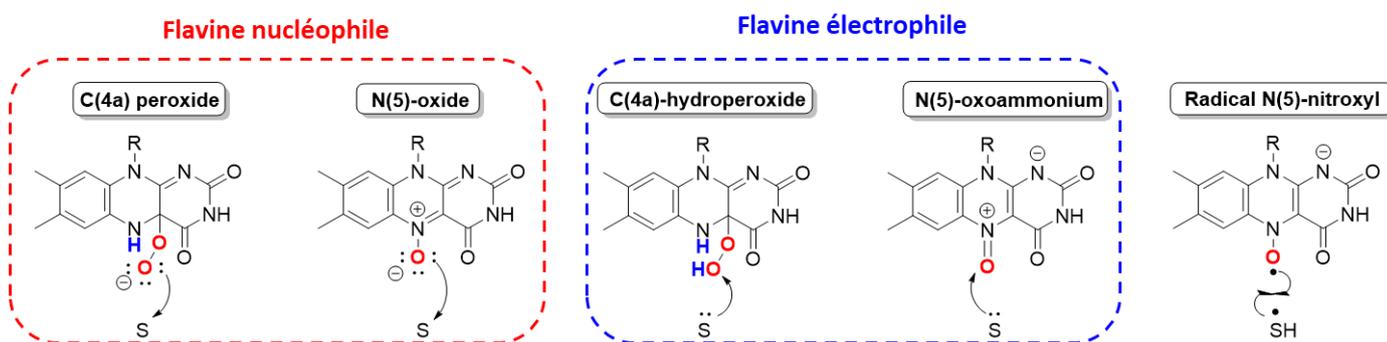


Figure 19 : Différente réactivité des différentes intermédiaire flavinique.

### 3. Les flavines réductases : exemple de la cytochrome P450 réductase

Comme les flavines monooxygénases vues précédemment, les flavines réductases sont capables de catalyser la réduction de flavines à l'aide de NADPH,<sup>[45]</sup> mais à des fins différentes des MO.

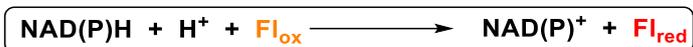


Figure 20 : Réaction catalysée par les flavines réductases.

Les flavines réductases sont impliquées dans plusieurs processus biologiques, notamment, la bioluminescence, l'activation du dioxygène ou encore la métabolisation du fer. Elles permettent de collecter efficacement des électrons à partir de NAD(P)H grâce à leur cofacteur flavinique (FAD ou FMN) puis de délivrer des électrons de façon séquentielle à un partenaire redox.<sup>[46]</sup> La réduction des flavines libres par NAD(P)H en solution n'est par ailleurs que très peu efficace avec des cinétiques très lentes à concentration physiologique.<sup>[47]</sup> Une étude a montré que des activités réductases étaient présentes dans divers tissus humains (foie, rein, cœur...)<sup>[48]</sup>

Les cytochromes P450 (cytP450) représentent une des plus grandes familles d'enzymes avec pas moins 18000 séquences identifiées. C'est une enzyme ubiquitaire, capable d'effectuer des réactions d'oxydation impliquées dans de nombreux procédés vitaux comme, la biosynthèse de stéroïdes, de lipides ou encore la dégradation de xénobiotiques afin de faciliter leur excrétion. Il existe énormément de cytochrome P450 de types différents. Tous les cytP450 possèdent un même groupement prosthétique, la protoporphyrine IX de fer(III), qui est liée à la protéine par une liaison de coordination entre son ion fer(III) et un atome de soufre d'un résidu cystéinate.

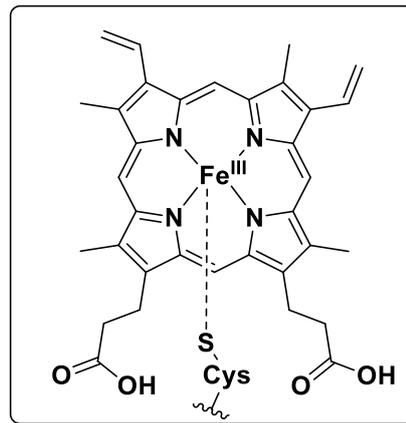


Figure 21 : Protoporphyrine IX de fer (III) lié à la protéine via une cystéine (hème).

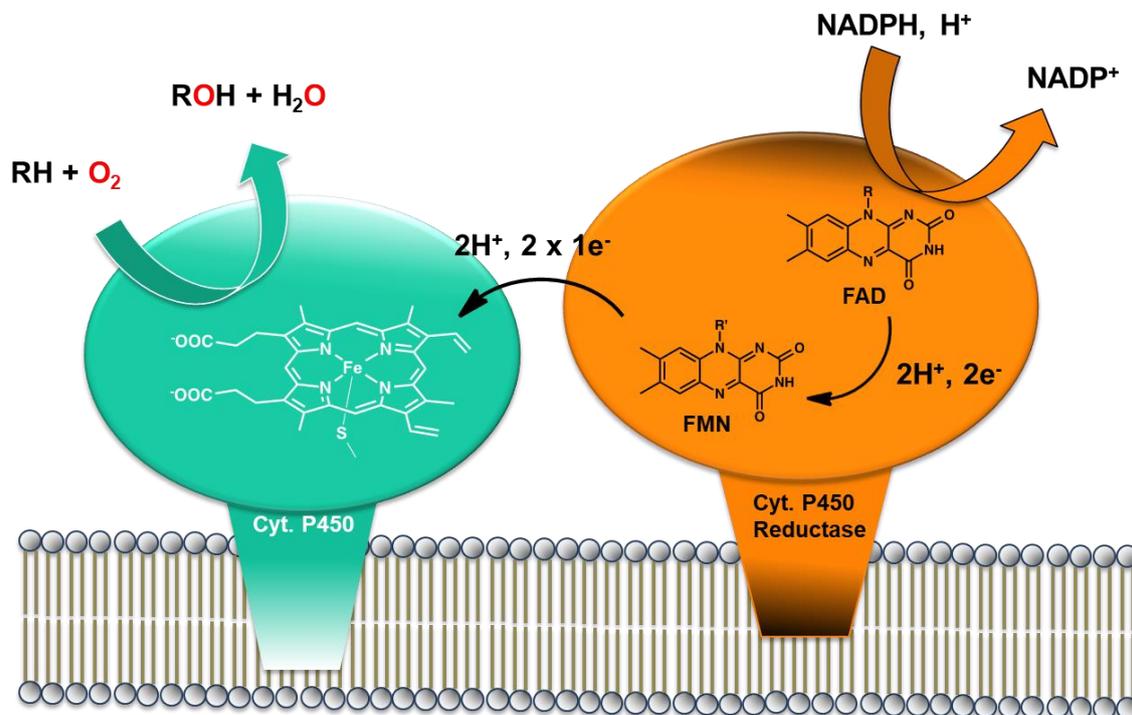


Figure 22 : Transfert d'électrons à l'intérieur du complexe cytP450.

Deux étapes clés du cycle catalytique des cytP450 requièrent à deux moments bien précis l'apport d'un électron. Un premier électron pour réduire le Fe(III) de l'hème en Fe(II) qui fixe ensuite le dioxygène pour former le complexe "oxy" Fe(II)O<sub>2</sub>, puis un second électron pour former l'intermédiaire peroxy. Ces électrons ont besoin d'être délivrés séquentiellement au centre catalytique. Cette tâche est réalisée par une enzyme de type réductase, une NADPH cytochrome P450

réductase, articulée autour de deux cofacteurs flaviniques au sein de la même protéine (FMN / FAD). Comme on peut le voir sur la Figure 22, NADPH réduit d'abord FAD en FADH<sub>2</sub> qui va ensuite transférer ses deux électrons à la FMN afin d'obtenir FMNH<sub>2</sub>. C'est cette dernière espèce qui va transférer un à un ses électrons à l'hème.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, c'est cette activité réductase qui a été étudiée précédemment au laboratoire.<sup>[6]</sup> Dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire d'Innovation Moléculaire et Applications de Mulhouse, nous avons envisagé d'utiliser le flux d'électrons ainsi généré pour initier des réactions radicalaires en solution aqueuse.

## II. Utilisation de dérivés flaviniques pour la catalyse d'oxydation.

S'inspirer de la chimie enzymatique est un défi majeur que le chimiste contemporain doit relever. Pour catalyser leurs réactions, les enzymes ont recours à un site actif au sein duquel est enfoui le cofacteur flavinique dans un environnement hydrophobe avec une disposition bien particulière des acides aminés, offrant à l'enzyme une excellente sélectivité. Les objectifs de la chimie bioinspirée sont donc de mimer les fonctions enzymatiques responsables de la transformation chimique et également de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans cet environnement particulier. Les catalyseurs bioinspirés, basés sur un cofacteur flavinique, sont utilisés pour une large gamme d'applications en chimie organique, comprenant, l'oxydation de Dakin,<sup>[49,50]</sup> des thiols en disulfures,<sup>[51]</sup> des amines en imines,<sup>[52]</sup> mais également l'oxydation d'hydrazine en diimine, qui utilisée *in situ* permet l'hydrogénation d'oléfines.<sup>[53]</sup> Plus récemment, des réactions de Mitsunobu ou des cycloadditions de type [2+2] ont aussi été réalisées grâce à un catalyseur à base de flavines (Figure 23).<sup>[54,55]</sup> En plus de l'organocatalyse classique, les flavines sont largement utilisées en oxydation photocatalytique en raison de leurs propriétés photoactives.<sup>[55-60]</sup> Cependant, ces applications dépassent le cadre de cette thèse et nous présenterons uniquement les systèmes flaviniques utilisés pour des réactions d'oxydations de type Baeyer-Villiger, époxydations, sulfoxydations ou N-oxydations.

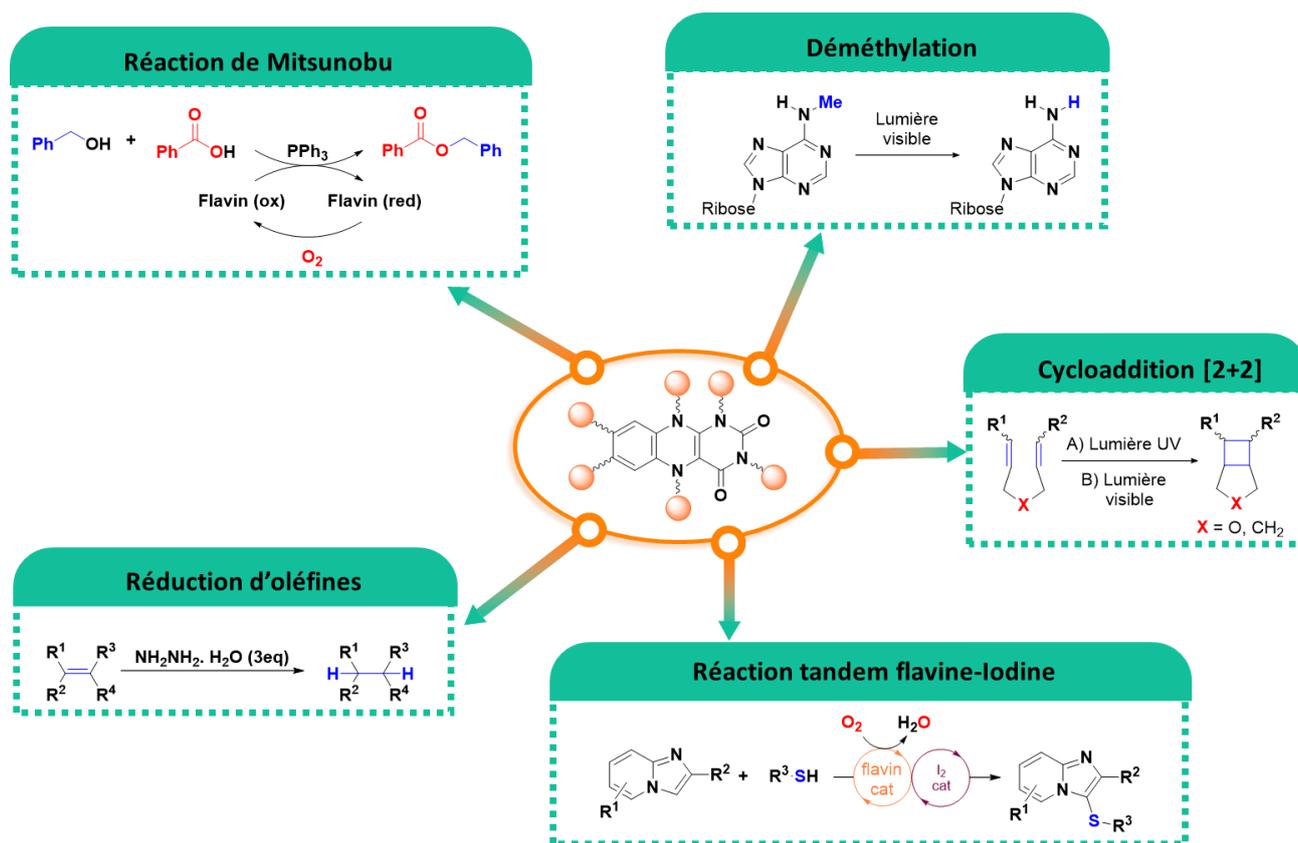


Figure 23 : Exemples de réactions catalysées par des dérivés flaviniques : réaction de Mitsunobu,<sup>[54]</sup> déméthylation,<sup>[56]</sup> cycloaddition [2+2],<sup>[55,61]</sup> réaction tandem flavine-iodine,<sup>[62-65]</sup> et réduction d'oléfines.<sup>[66]</sup> (Substituents ●)

## 1. Historique

L'introduction d'un oxygène de façon stéréo et/ou chimiosélective dans un substrat est une transformation clé dans la chimie de synthèse. Durant le siècle dernier, les oxydants à base de sels métalliques dans divers états d'oxydation ont été largement utilisés.<sup>[67]</sup> Cependant, dans le contexte actuel, leur utilisation a fortement diminué au profit d'oxydants moins polluants et plus éco-compatibles tels que le dioxygène ou le peroxyde d'hydrogène, qui ont fait l'objet d'énormément de recherches ces dernières années.<sup>[68]</sup> Comme nous l'avons vu précédemment, les flavoenzymes sont capables d'oxyder des substrats par activation réductrice du dioxygène. Par conséquent, les « monooxygénases artificielles » (c'est-à-dire des systèmes biomimétiques utilisant un intermédiaire (hydro)peroxo de type 5-EtFl<sub>OH</sub> en tant qu'agent oxydant) représentent une alternative de choix pour remplacer les oxydants classiques devenus écologiquement obsolètes.

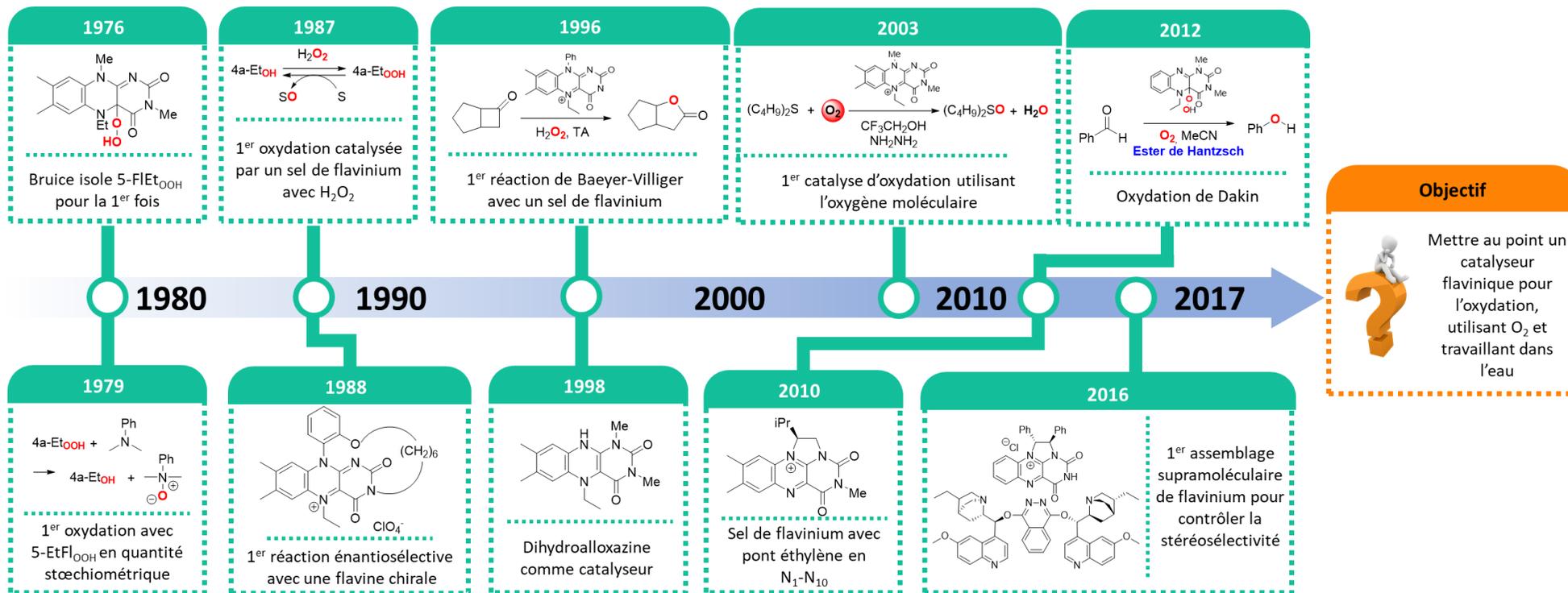


Figure 24 : Dates importantes pour les systèmes flaviniques artificiels utilisés en catalyse d'oxydation (jusqu'à 2017)

C'est en 1976 et 1977 que Bruice et al, ont montré que les dérivés 5-alkyl hydroperoxyflavines (5-EtFl<sub>OOH</sub>) (Figure 24) étaient significativement plus stables que leurs analogues natifs Fl<sub>OOH</sub>.<sup>[69,70]</sup> Ces composés peuvent être préparés à partir du sel de flavinium correspondant avec du peroxyde d'hydrogène ou grâce à une procédure plus biomimétique utilisant le dérivé alkylé en position 5 réduit en présence de dioxygène. Ainsi, en 1979, cette 5-alkyl-hydroperoxyflavine 5-EtFl<sub>OOH</sub> formée au préalable en quantité stœchiométrique a été utilisée avec succès en tant qu'agent oxydant pour réaliser l'oxydation de sulfures en sulfoxydes ou d'amines tertiaires en N-oxydes.<sup>[71]</sup> Ceci a permis de mettre en évidence la puissance de cette agent oxydant comparé au peroxyde d'hydrogène. Pour exemple, l'oxydation des sulfures en sulfoxydes par le 5-EtFl<sub>OOH</sub> est quatre fois plus rapide que l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène.<sup>[72]</sup> En revanche, son pouvoir oxydant reste inférieur à celui des peracides comme *m*CPBA, mais cette réactivité plus douce permet d'expliquer la haute sélectivité lors de l'oxydation des sulfures en sulfoxydes sans suroxydation en sulfones. Après plusieurs études sur la réactivité des hydroperoxyflavines utilisées en quantité stœchiométrique, Murahashi et al, ont été les premiers à démontrer qu'une quantité catalytique de sel de flavinium (5-EtFl<sup>+</sup> + ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>) avec du peroxyde d'hydrogène était suffisante pour effectuer des réactions de N-oxydation et de sulfoxydation. Dans ce cas, 5-EtFl<sub>OOH</sub> est formé in situ grâce à l'addition du peroxyde d'hydrogène sur le sel de flavinium qui peut donc se comporter comme un véritable catalyseur.<sup>[73,74]</sup> Dans le même temps, Shinkai et al, mettent au point une flavine chirale permettant de réaliser des réactions de sulfoxydation de façon énantiosélective.<sup>[75]</sup> L'année 2003 marque un tournant dans la catalyse d'oxydation avec des sels de flaviniums. En effet, l'équipe de Murahashi a montré pour la première fois qu'il était possible de faire de la catalyse d'oxydation à l'aide de l'oxygène moléculaire et de sels de flavinium.<sup>[76]</sup> D'une façon générale, les études actuelles accordent une attention croissante à l'ensemble des d'oxydations possibles avec ces sels de flavinium (Figure 24).<sup>[49,77,78]</sup>

## 2. Réactions d'oxydations catalysées par des dérivés flaviniques avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Le perchlorate de 5-Ethyl-3,7,8,10-tetramethylisoalloxazinium (FlEt<sup>+</sup>ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>) a été le premier dérivé de flavine à être utilisé en catalyse d'oxydation en raison de sa stabilité et de son efficacité, avec le peroxyde d'hydrogène comme source d'oxygène. Ces travaux, tout aussi importants que ceux de Bruice réalisés 10 ans plus tôt, marquent le début de la catalyse à base de cofacteurs flaviniques de synthèse.<sup>[71,73]</sup> Le catalyseur 1 a ainsi permis l'oxydation de divers sulfures en sulfoxydes correspondantes avec d'excellents rendements et sans suroxydation (Figure 25). Les sulfoxydes sont

des intermédiaires importants dans la synthèse de composés biologiquement actifs, il était donc primordial de mettre au point une nouvelle voie de synthèse éco-compatible n'utilisant pas de métaux de transition.

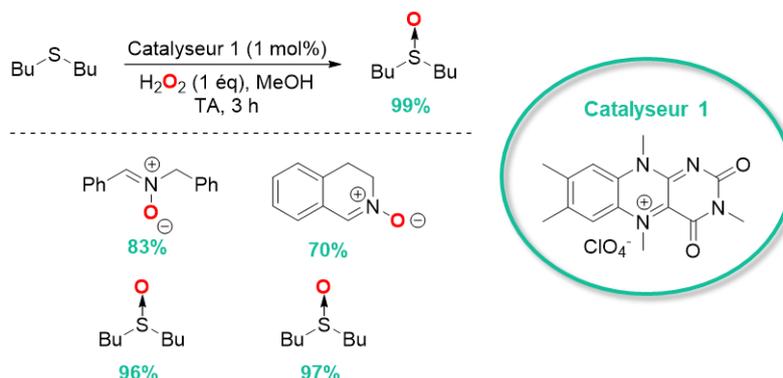


Figure 25 : Structure du catalyseur 1 et réactions de sulfoxydations et N-oxylations qu'il catalyse.

Le mécanisme des sulfoxydations catalysées par ces sels de flaviniums débute par la formation de la 4a-hydroperoxy-isoalloxazine (EtFl<sub>OOH</sub>) à partir du sel de flavinium de départ et du peroxyde d'hydrogène. Ensuite, en oxydant le substrat, cet intermédiaire se transforme en hydroxyisoalloxazine qui subit l'élimination d'une molécule d'eau permettant la régénération du catalyseur initial. La décomposition de l'espèce flavinique EtFl<sub>OOH</sub> en 10a-spirohydantoin a été observée, mais cette étape reste extrêmement lente en comparaison avec l'étape d'oxydation du substrat. La sulfoxydation étant la réaction la plus étudiée avec les catalyseurs de type flaviniques, les principaux travaux sur les relations structure activité de ces catalyseurs ont donc été effectués sur cette réaction. La réaction est ainsi devenue une valeur étalon pour les nouveaux catalyseurs flaviniques et la cinétique de l'oxydation du thioanisole a été étudiée en détail par « stopped-flow » dans le méthanol à 30 °C (Figure 26).<sup>[73]</sup>

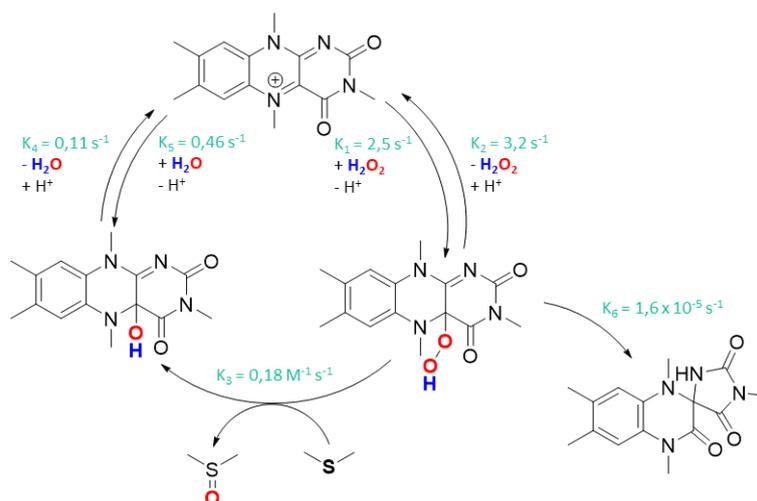


Figure 26 : Cycle catalytique et données cinétiques pour l'oxydation du thioanisole par  $\text{H}_2\text{O}_2$  avec le sel de 5-Ethyl-3,7,8,10-tetramethylalloxazinium perchlorate ( $\text{FIET}^+\text{ClO}_4^-$ ).

Tout comme les sels d'isoalloxazinium (Catalyseur de type 1, Figure 25), leurs isomères de position peuvent eux aussi catalyser des réactions d'oxydation en utilisant le peroxyde d'hydrogène. Bäckvall fut le premier à décrire l'utilisation des 5-Alkyldihydroalloxazines pour catalyser des N-oxydations, ce qui de plus, constitue le premier système impliquant l'utilisation d'une flavine alloxazine complètement réduite (Figure 27). La réaction peut être également élargie aux sulfures allyliques et vinyliques, avec une sélectivité totale pour la sulfoxydation.<sup>[79,80]</sup>

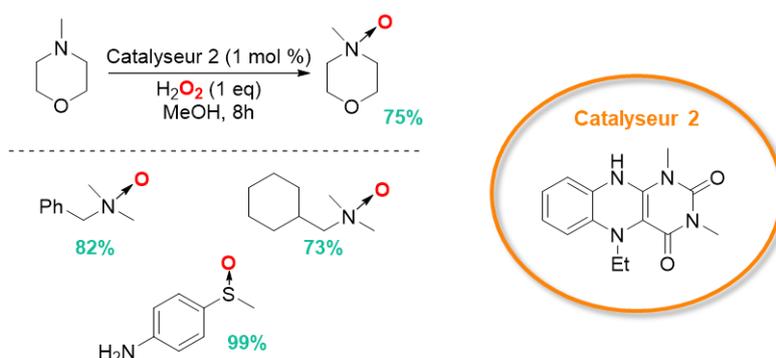


Figure 27 : Structure du catalyseur 2 et réactions de sulfoxydation et N-oxydation qu'il catalyse.

Le sel d'alloxazinium est initialement formé lors du premier cycle catalytique avec  $\text{O}_2$ . En effet, la 5-Alkyldihydroalloxazine réagit tout d'abord avec l'oxygène moléculaire pour former l'intermédiaire hydroperoxyde ( $\text{EtFl}_{\text{OOH}}$ ) qui va oxyder le substrat. L'hydroxyalloxazine ainsi formée

subit une déshydratation donnant le sel d'alloxazinium, qui sera ensuite engagé dans un nouveau cycle catalytique avec  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

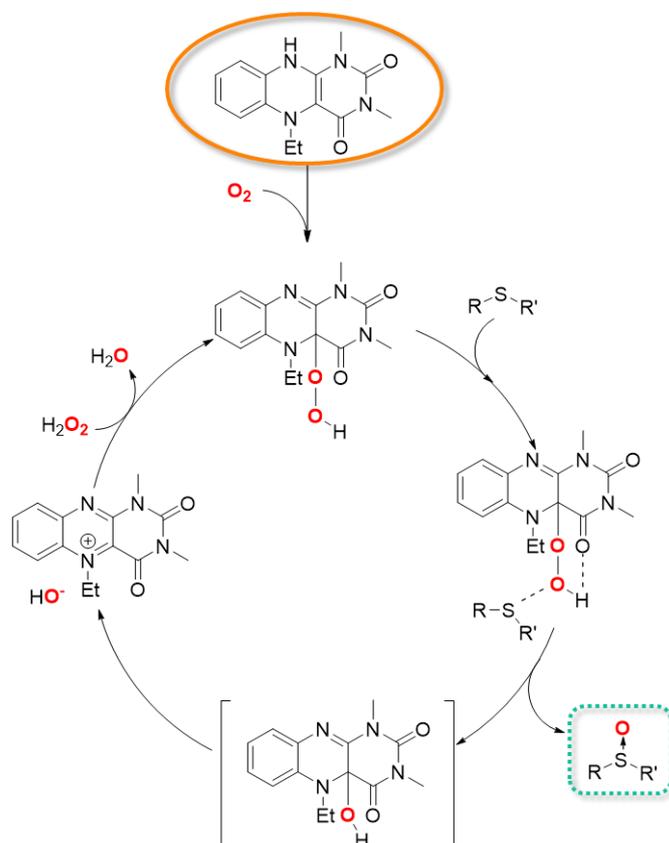


Figure 28 : Cycle catalytique pour l'oxydation avec le catalyseur 2.

Bäckvall et *al.* ont ainsi montré, pour 8 amines aliphatiques de structures différentes, que l'oxydation en N-oxyde utilisant le peroxyde d'hydrogène est accélérée d'un facteur 50 en moyenne pour les réactions réalisées en présence de 2,5 mol% de catalyseur et ceci avec des TON pouvant aller jusqu'à 182 lorsque la charge catalytique est abaissée à 0,4 mol% (Figure 29).

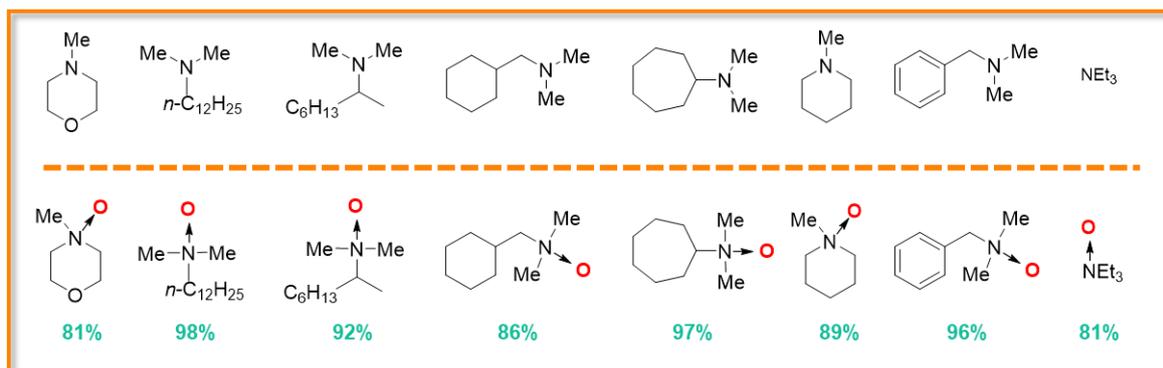


Figure 29 : Premières amines oxydés par Bäckvall (conversion après 1 heure de réaction).<sup>[79]</sup>

En 2001, puis plus récemment en 2010, les sels d'alloxazinium pontés avec un groupement éthylène entre la position N<sup>1</sup> et N<sup>10</sup> (catalyseurs de type 3), se sont également distingués en catalyse d'oxydation avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Contrairement à leurs homologues (catalyseurs de type 2), ces sels peuvent subir une attaque nucléophile en position 10a, ce qui a pour conséquence la formation d'une nouvelle espèce oxydante lors d'une réaction avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Comme le décrit Carbery, la réactivité peut-être sensiblement améliorée avec l'introduction d'un groupement électroattracteur sur le noyau alloxazinium.<sup>[78,81,82]</sup>

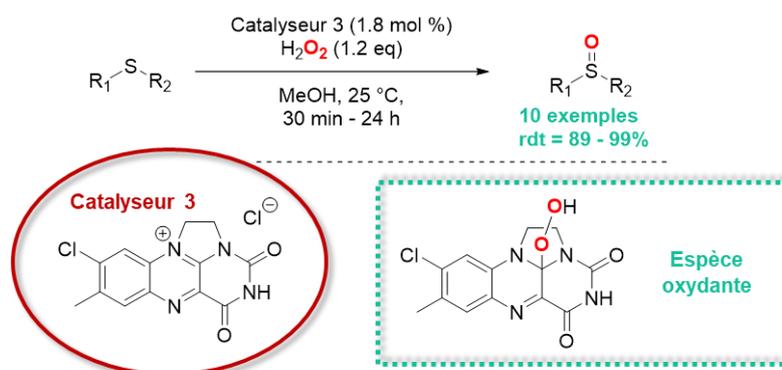


Figure 30 : Structure du catalyseur 3 ponté en N<sup>1</sup>-N<sup>10</sup> et réactions de sulfoxydations qu'il catalyse.<sup>[82]</sup>

De ce fait, depuis 40 ans, de nombreux catalyseurs flaviniques efficaces et facilement disponibles ont été synthétisés. Ils peuvent être classés en quatre groupes. **Les Catalyseurs de type 1** (les sels isoalloxaziniums tels que 1a, leurs dérivés 1,5-dihydro 1H et les peroxy correspondant 4a-hydroperoxy) pour lesquels, l'équipe d'Imada a notamment mis au point une méthode de synthèse fiable et peu polluante (Figure 31).<sup>[80]</sup> Les **catalyseurs de type 2** de type alloxazinium et leurs dérivés

5,10- dihydro-4a-hydroperoxo développés pour la première fois par Bäckvall en 1988 (Figure 32). Les **catalyseurs de type 3** dont les positions N<sub>1</sub>-N<sub>10</sub> sont pontées par un bras alkyle (Figure 33) et enfin les **catalyseurs de type 4** qui regroupent les flavines neutres d'isoalloxazines non substituées en position 5 et qui ont principalement été utilisées en photocatalyse (Figure 34).

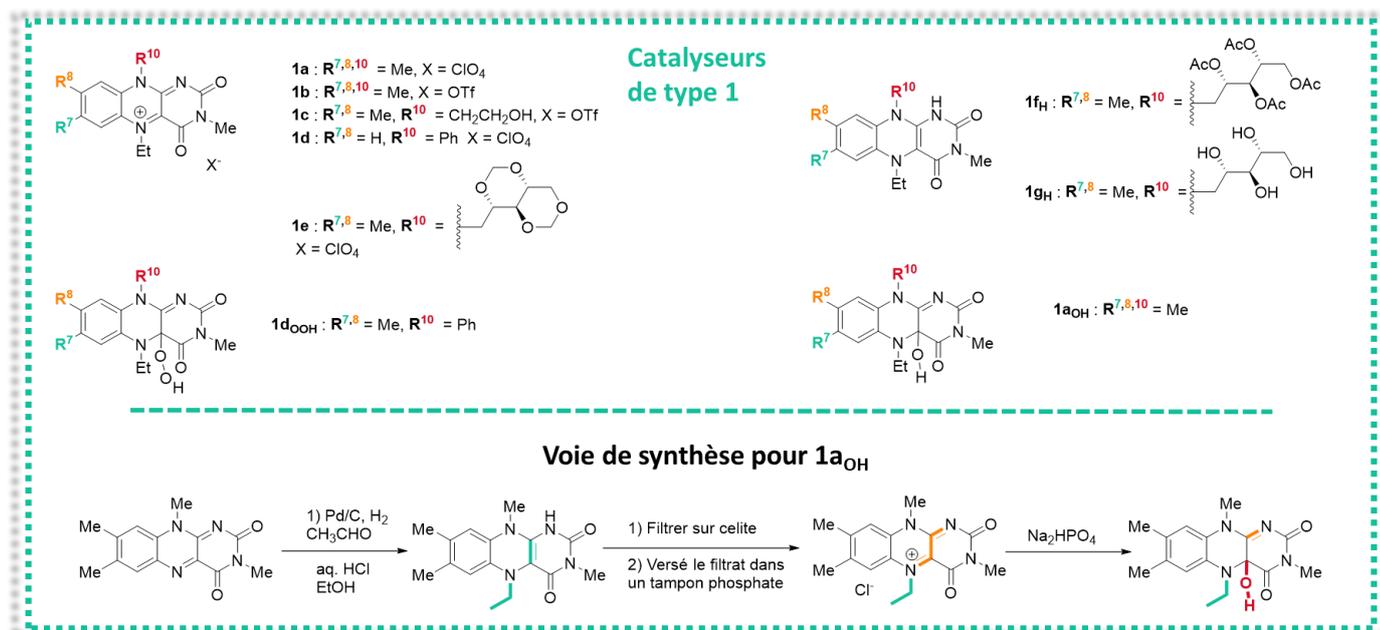


Figure 31 : Catalyseurs de type 1 (isoalloxaziniums) et voie de synthèse du catalyseur 1a<sub>OH</sub>.<sup>[83,84]</sup>

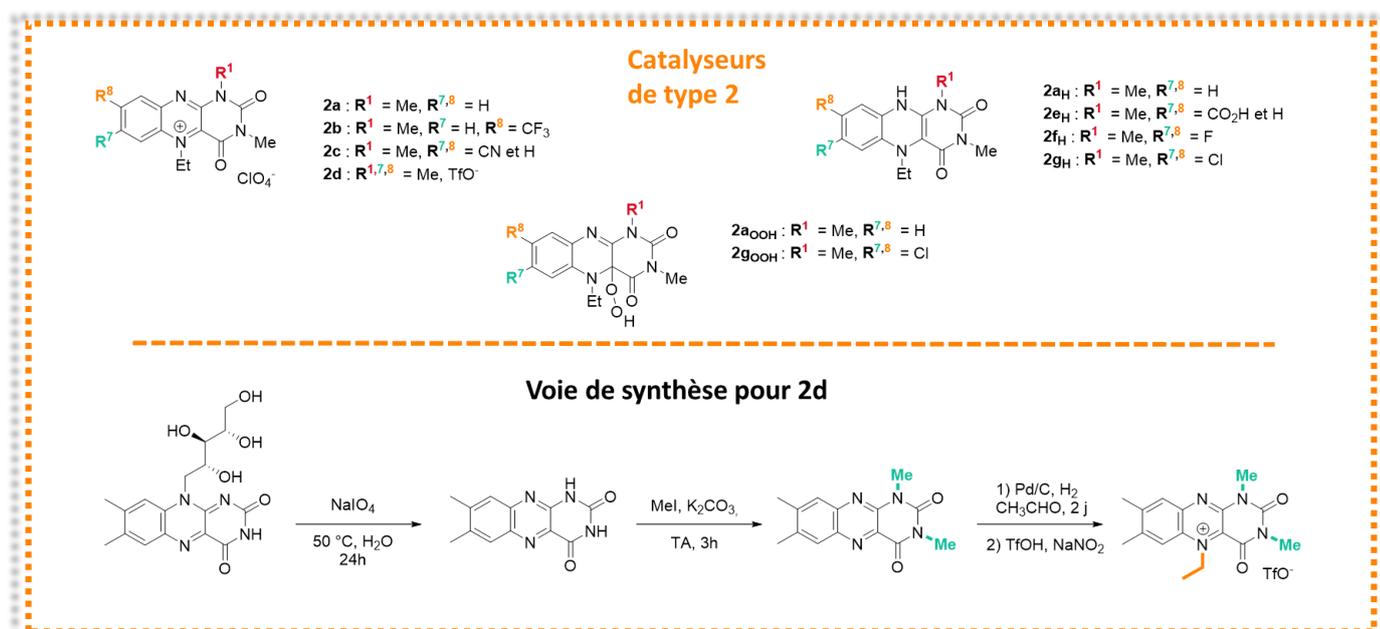


Figure 32 : Catalyseurs de type 2 (alloxazines) et voie de synthèse du catalyseur 2d.<sup>[85]</sup>

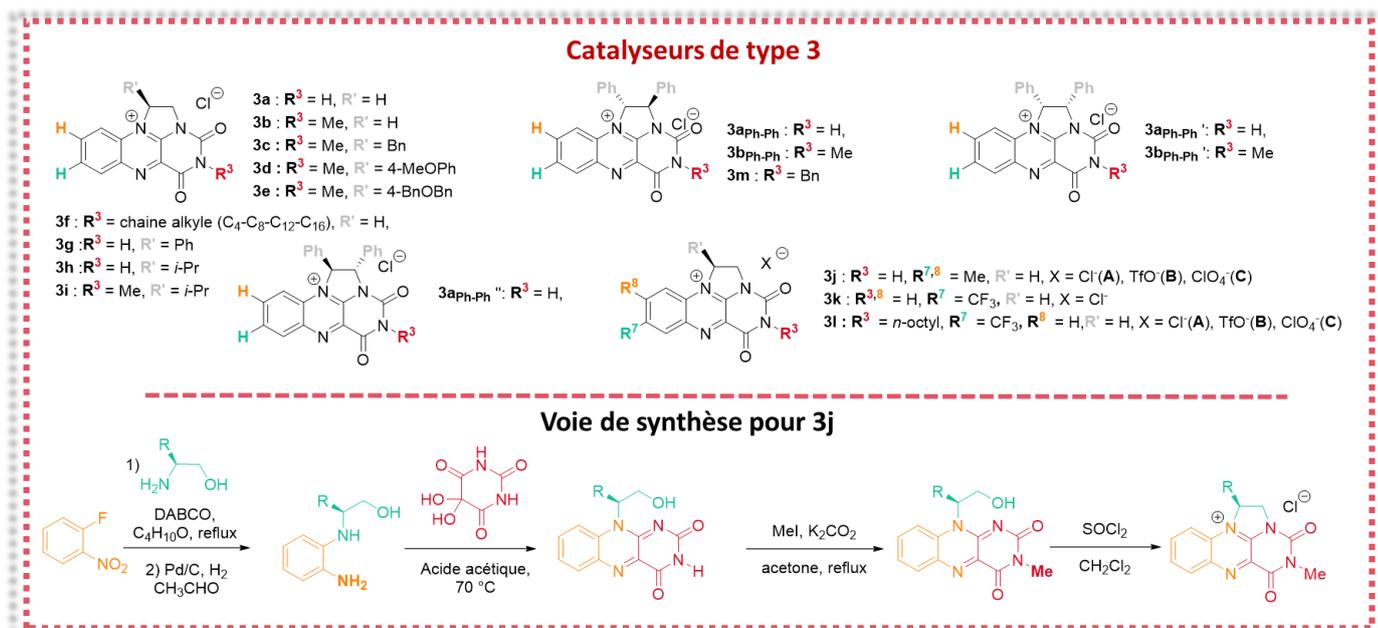


Figure 33 : Catalyseurs de type 3 (alloxaziums pontés) et voie de synthèse du catalyseur 3j.<sup>[54,62,86,87]</sup>

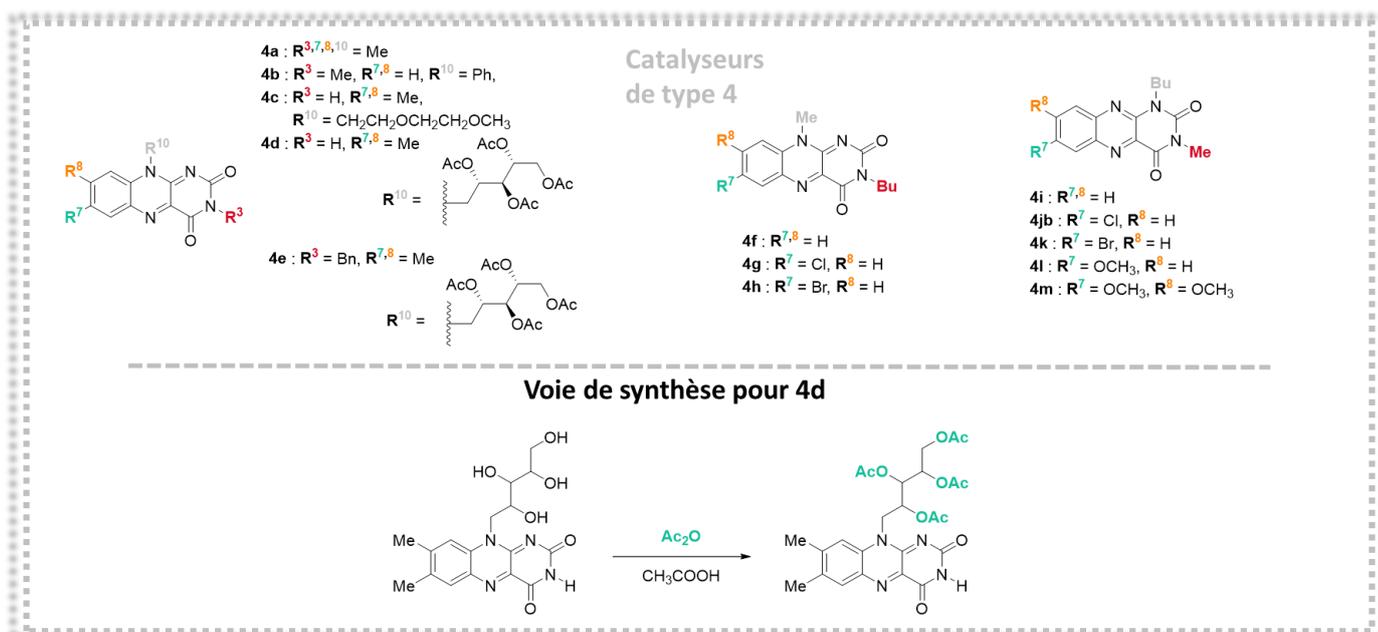


Figure 34 : Catalyseurs de type 4 (flaviniques) et voie de synthèse du catalyseur 4d.<sup>[55,59,61]</sup>

Bäckvall *et al.* ont utilisé un mélange d'alloxazines réduites 1,3,5-trialkylées portant un groupe carboxylate en position 7 ou 8 (catalyseur **2e<sub>H</sub>**) dans un liquide ionique, le Méthylimidazolium(BMIm)<sup>+</sup> hexafluorophosphate (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>) en tant que catalyseur recyclable qui est capable d'oxyder une variété de sulfures en sulfoxydes avec de très bons rendements en utilisant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il a ainsi été démontré que ce catalyseur, utilisé dans un liquide ionique, pouvait être recyclé jusqu'à 7 fois sans perte de rendement ou de sélectivité (Figure 35).<sup>[88]</sup>

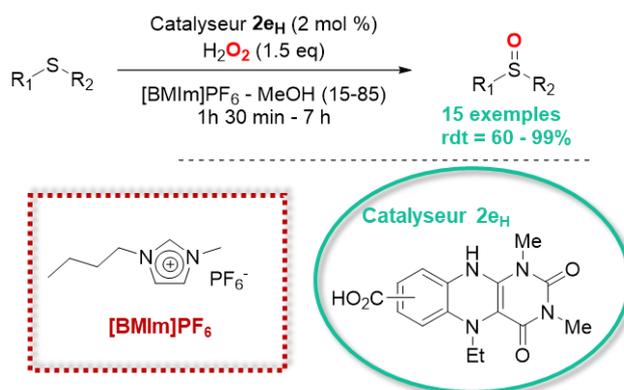


Figure 35 : Sulfoxydation catalysée par le dihydroalloxazine 2e<sub>H</sub> dans le liquide ionique [BMIm]PF<sub>6</sub>.<sup>[88]</sup>

Un système de catalyse par transfert de phase a également vu le jour grâce à l'équipe de Cibulka. Des dérivés d'alloxazines pontés (catalyseur **3b-3f**) agissent comme catalyseurs pour l'oxydation de sulfures en sulfoxydes avec du peroxyde d'hydrogène dans un mélange hétérogène eau/chloroforme ou eau/dichlorométhane. L'efficacité de la réaction est dépendante du pH de la solution aqueuse, avec des rendements maximums à pH = 7,0 (pH proche du pK<sub>R+</sub> des alloxaziniums **3** qui est de 7,2 pour 3b). Dans ces conditions, la conversion complète des sulfures se fait en moins de 24 heures avec de bons rendements, alors que la réaction non catalysée donne seulement des traces de produit oxydé (Figure 36).<sup>[89-91]</sup> L'oxydation par transfert de phase avec des sels d'alloxaziniums amphiphiles utilise la réversibilité de la liaison covalente entre le sel d'alloxazinium et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine formé devient suffisamment lipophile pour pouvoir passer dans la phase organique contenant le substrat et ainsi effectuer la réaction. Hydroxyflavine 3-OH élimine ensuite une molécule d'eau à l'interface et permet de reformer le catalyseur **3**.

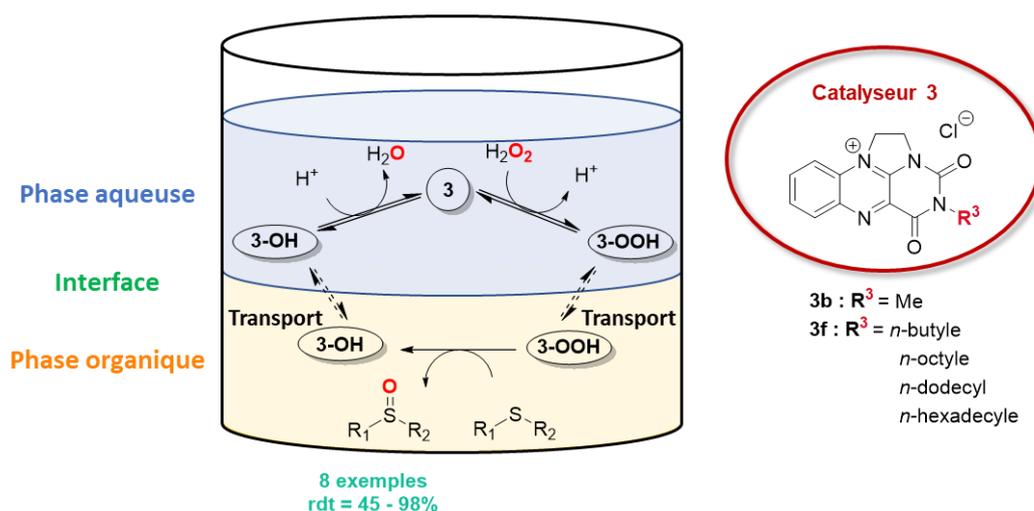


Figure 36 : Représentation schématique de la catalyse d'oxydation par transfert de phase utilisant les catalyseurs (3b-3f).

La première utilisation de dérivés flaviniques pour la catalyse d'oxydation de type Baeyer-Villiger a été rapportée par Furstoss et al. en utilisant le sel d'isoalloxazinium **1d** en tant que catalyseur. Dans ce cas, les cétones peuvent être converties en lactones correspondantes avec de bons rendements (Figure 37),<sup>[92]</sup> de manière chimiosélective et avec un mécanisme similaire à celui présenté pour la sulfoxydation (Figure 26).

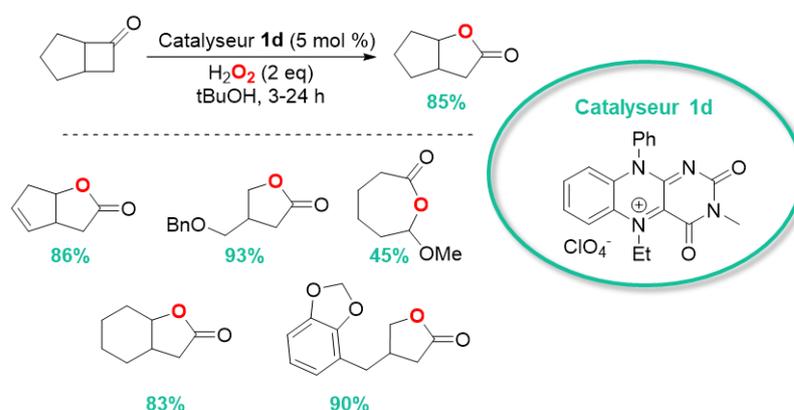


Figure 37 : Structure du catalyseur **1d** et réactions de Baeyer-Villiger catalysées avec  $H_2O_2$  comme oxydant.

D'un point de vue plus global, une étude de relation structure-activité a été réalisée avec différents sels de flavinium dérivés de la riboflavine, qui ont été comparés à l'aide des réactions d'oxydations de trois substrats : les sulfures, les amines tertiaires et les cyclobutanones (Figure 38).<sup>[85]</sup>

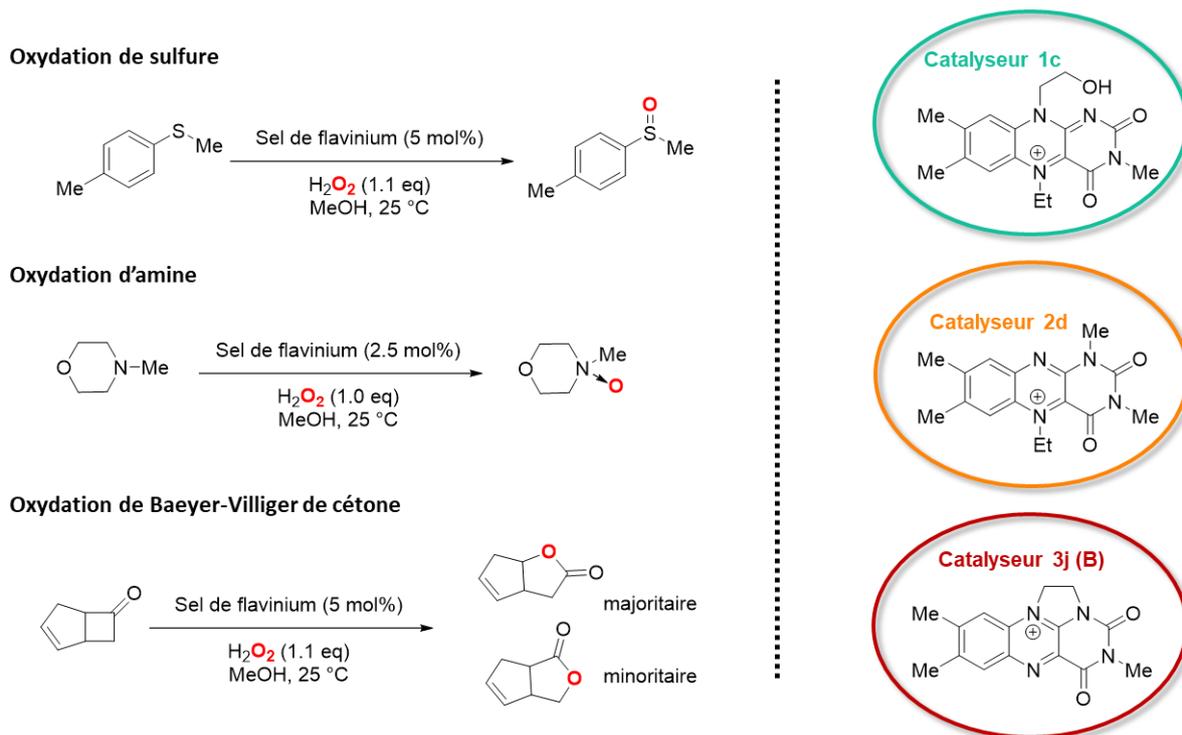


Figure 38 : Différentes réactions d'oxydations réalisées avec des sels de flaviniums.

Les vitesses initiales de ces différentes réactions ont été mesurées en présence ( $V_{obs}$ ) et en absence ( $V_0$ ) du catalyseur. Lors de l'oxydation des sulfures, le sel d'isoalloxazinium (**1c**) montre une activité nettement supérieure par rapport aux sels d'alloxaziniums (**2d** et **3j**). L'activité plus élevée de **1c** peut être expliquée par son caractère plus électrophile qui favorise la génération de l'espèce active FLOOH à partir du sel de flavinium et du peroxyde d'hydrogène. En effet, comme l'a signalé l'équipe de Cibulka, les sels d'alloxazinium ont un caractère électrophile moins important que leurs isomères isoalloxazinium et leurs réactions avec  $H_2O_2$  est, de ce fait, moins favorable. Par ailleurs, concernant les catalyseurs de type **1**, c'est l'élimination de  $H_2O$  de l'hydroxyisoalloxazine qui est l'étape limitante (Figure 26).<sup>[73]</sup> En ce qui concerne la N-oxydation des amines tertiaires, les conditions basiques de la réaction favorisent la réaction de  $H_2O_2$  avec **2d** et **3j**, améliorant l'activité de ces catalyseurs.<sup>[93]</sup> Mais le rendement, très faible (10%) pour le catalyseur **3j** est dû à sa décomposition en milieu basique.<sup>[78]</sup> Pour l'oxydation de Baeyer-Villiger d'une cyclobutanone, les conditions étant neutres comme pour la sulfoxydation, l'ordre des catalyseurs reste inchangé (**1c** > **2d** > **3j**). Pour résumer, **1c** présente une meilleure activité que **2d** et **3j** dans des conditions neutres alors que **2d** est favorisé en conditions basiques. Pour conclure, **3j** possède une activité catalytique moins intéressante que **1c** et **2d**, mais il est plus facilement accessible à grande échelle à partir de la riboflavine.<sup>[85]</sup>

Tableau 5 : Activité catalytique de différents catalyseurs pour trois réactions d'oxydations.

Entrée	Catalyseur	Sulfoxydation $V_{obs} / V_0$ ( $V_0 = 2,3 \mu\text{mol/L}$ )	N-oxydation $V_{obs} / V_0$ ( $V_0 = 2,3 \mu\text{mol/L}$ )	Baeyer-Villiger $V_{obs} / V_0$ ( $V_0 = 2,3 \mu\text{mol/L}$ )
1	1c	98	9,1	> 150
2	2d	2,1	94	8,6
3	3j	2,2	15	16

Très récemment, l'équipe d'Iida a utilisé un support polymérique anionique dérivé de la chitine qui interagit par liaisons ioniques, à la fois avec le catalyseur de type flavinium et avec des cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{Li}^+$ . Ce catalyseur supramoléculaire a notamment été utilisé avec succès pour catalyser des réactions de sulfoxydation et d'oxydation de Baeyer-Villiger dans des conditions éco-compatibles. De plus, l'assemblage ionique étant stable dans les conditions réactionnelles, le catalyseur peut être facilement récupéré par simple filtration, puis réutilisé jusqu'à 7 fois sans perte de rendement (Figure 39). [94]

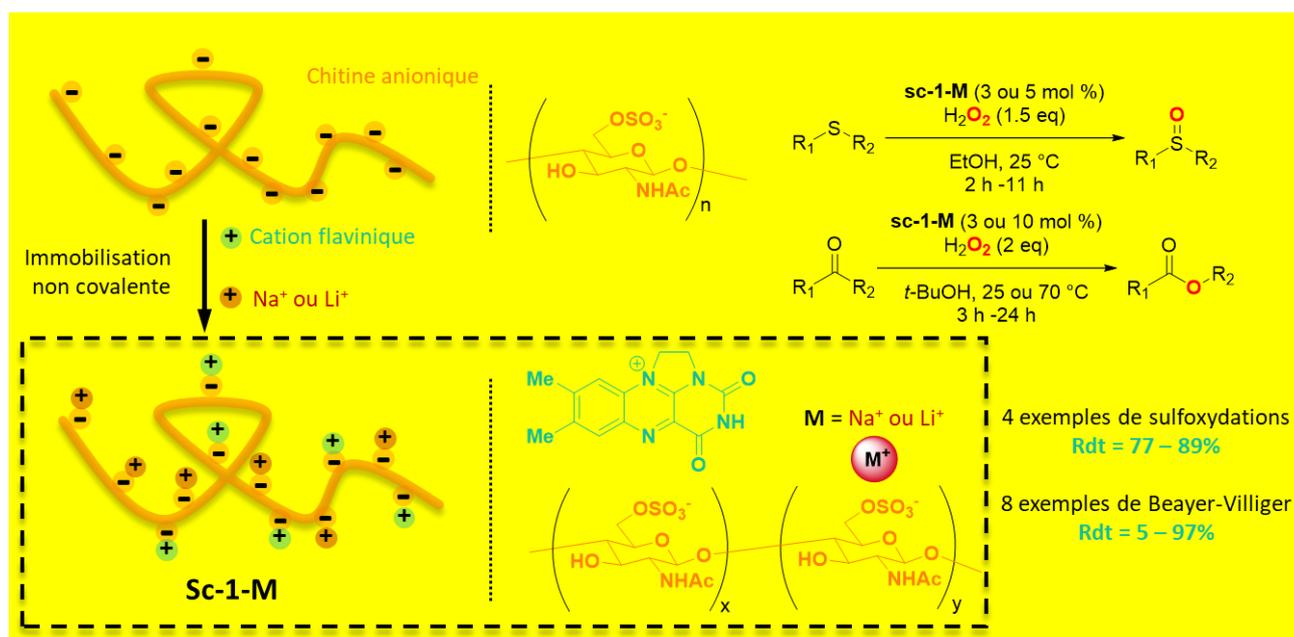


Figure 39 : Représentation schématique du catalyseur flavinique supramoléculaire à base de chitine et réactions de sulfoxydations et de Baeyer-Villiger catalysées.

L'association du catalyseur flavinique, du polymère et du métal alcalin permet à l'assemblage moléculaire d'avoir une activité nettement supérieure pour l'oxydation de Baeyer-Villiger des cétones cycliques par rapport au catalyseur flavinique en solution homogène dépourvue du polymère et du métal. Ceci peut être expliqué, par le fait que le catalyseur flavinique est responsable de

l'activation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tandis que l'acidité de Lewis du cation métallique et les liaisons hydrogènes avec le polymère activent la cétone (Figure 40).

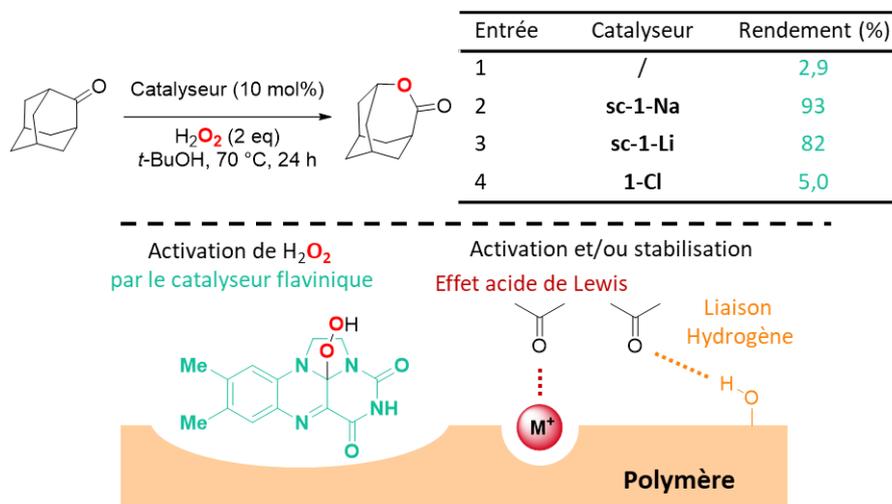


Figure 40 : Réaction de Baeyer-Villiger catalysée par le catalyseur flavinique supramoléculaire et représentation schématique des différents effets durant la catalyse.

### 3. Réactions d'oxydations catalysées par des dérivés flaviniques chiraux avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### a) Sulfoxydations asymétriques avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Concevoir des composés énantiomériquement purs est primordial pour l'industrie chimique en général et pour l'industrie pharmaceutique en particulier. En effet, une grande partie des systèmes biologiques reconnaissent deux énantiomères d'une même molécule comme étant deux substances bien distinctes. De nombreux composés pharmaceutiques possèdent des propriétés biologiques différentes en fonction de leur configuration absolue et l'histoire est là pour nous le rappeler avec le tristement célèbre exemple du thalidomide (Figure 41).<sup>[95]</sup>

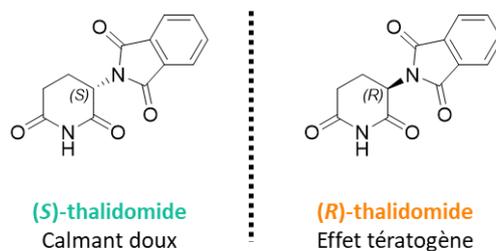


Figure 41 : Les énantiomères (S) et (R) du thalidomide.

La première utilisation de dérivés flaviniques chiraux pour l'oxygénation stéréosélective revient à l'équipe de Shinkai en 1988. Les auteurs ont décrit qu'avec une quantité de 10 mol% du catalyseur **A1** (Figure 42) et en ajoutant du peroxyde d'hydrogène séquentiellement à cinq reprises sur une durée de cinq jours, l'oxydation de dérivés sulfurés dans un mélange éthanol/eau à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  produisait de façon préférentielle les énantiomères (*R*) avec des excès énantiomériques compris entre 19 et 65%. Dans les mêmes conditions, mais en absence de catalyseur, aucun produit d'oxydation n'est observé.<sup>[75]</sup>

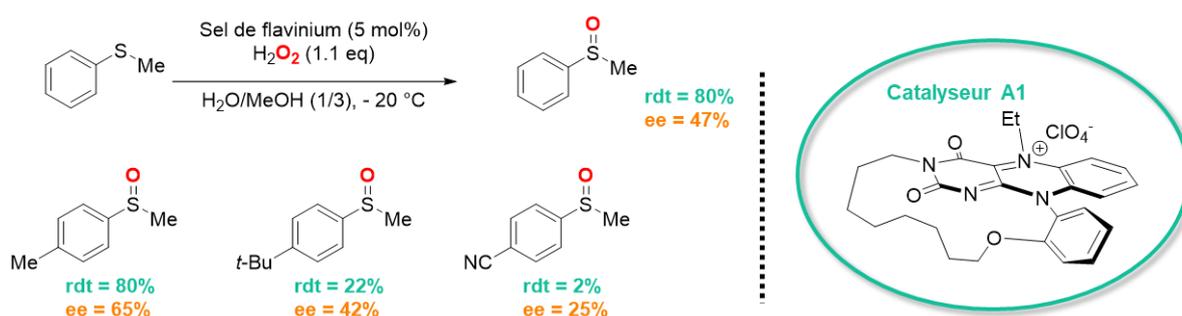


Figure 42 : Oxydation de quatre méthyl-aryl thioéthers à l'aide d'un catalyseur chiral.

Une dizaine d'années plus tard, un catalyseur similaire à celui utilisé par Shinkai a permis d'effectuer la sulfoxydation du méthyl  $\beta$ -naphtyle thioéther grâce également à des flavines à « coiffes chirales » (Figure 43). La présence de la coiffe d'un seul côté de la flavine permet d'obtenir une hydroperoxyflavine homochirale et d'orienter ainsi l'attaque du substrat sur la même face. En utilisant ces catalyseurs à coiffes, le méthyl- $\beta$ -naphtyle thioéther peut être oxydé avec un excellent rendement (94%) et un très bon excès énantiomérique (72%). L'énantiosélectivité est due à l'interaction  $\pi$ - $\pi$  entre les deux cycles aromatiques.<sup>[96]</sup>

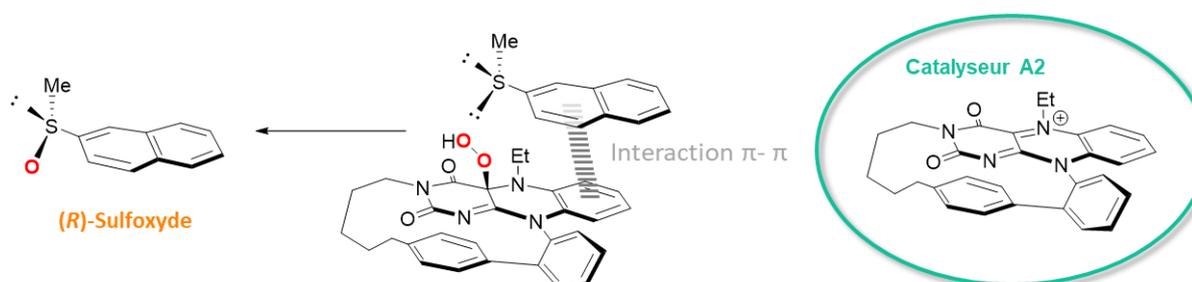


Figure 43 : Représentation schématique de l'hydroperoxyflavine homochirale de A2 et de l'interaction  $\pi$ - $\pi$  entre le catalyseur A2 et le méthyl  $\beta$ -naphtyle thioéther.

En 2013, l'équipe de Cibulka met au point des catalyseurs flaviniques chiraux (catalyseur **A3-4-5**), substitués par un dérivé de naphthalène en position N<sub>10</sub> qui bloque une face du squelette flavinique, ne laissant l'accès qu'à la face non encombrée à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et au substrat. L'oxydation de divers sulfures aromatiques par ces catalyseurs a permis d'obtenir des excès énantiomériques allant jusqu'à 61%. Il a également été montré que ces catalyseurs fonctionnaient pour l'oxydation stéréosélective de sulfures aliphatiques substitués par un groupement *tert*-butyle. Dans ce cas, la stéréosélectivité est contrôlée par des effets stériques en fonction de l'orientation du groupement *t*-butyle. Ceci est confirmé par la configuration absolue du sulfoxyde obtenue en fin de réaction ((S) pour le sulfure aromatique et (R) pour l'aliphatique) (Figure 44).<sup>[97]</sup>

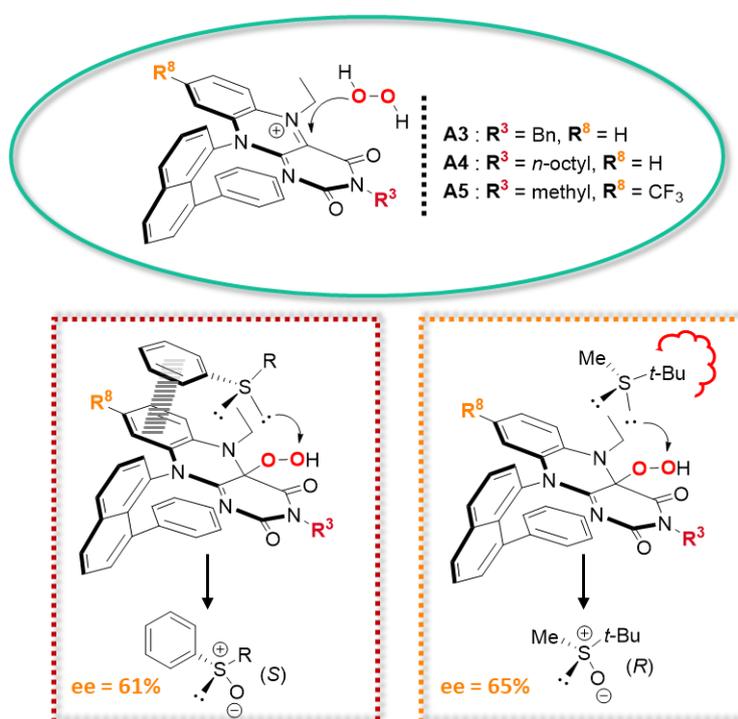


Figure 44 : Sels d'isoalloxaziniums chiraux (A3-A4-A5) et leur mode d'action en fonction du substrat.

Des catalyseurs de types supramoléculaires, inspirés de la catalyse enzymatique, ont été conçus à partir d'un sel de flavinium relié par liaison covalente (liaison amide<sup>[98,99]</sup> ou triazole<sup>[100]</sup>) à une cyclodextrine. Ils catalysent l'oxydation énantiosélective de divers sulfures avec une grande facilité, dans un milieu complètement aqueux et avec une charge catalytique de 1 mol%, pouvant descendre jusqu'à 0,2 mol% dans certains cas. Les méthodes de synthèse relativement simples, couplage entre une flavine contenant une fonction acide carboxylique et une 6-aminocyclodextrine par liaison peptidique, ou l'addition d'un alcynes vrai porté par une flavine avec un azoture pour la

formation du triazole, ont permis de préparer une série de composés, différents les uns des autres par la taille de leur cavité ( $\beta$  ou  $\alpha$ ), l'orientation des groupements flaviniques ou la longueur de l'espaceur.

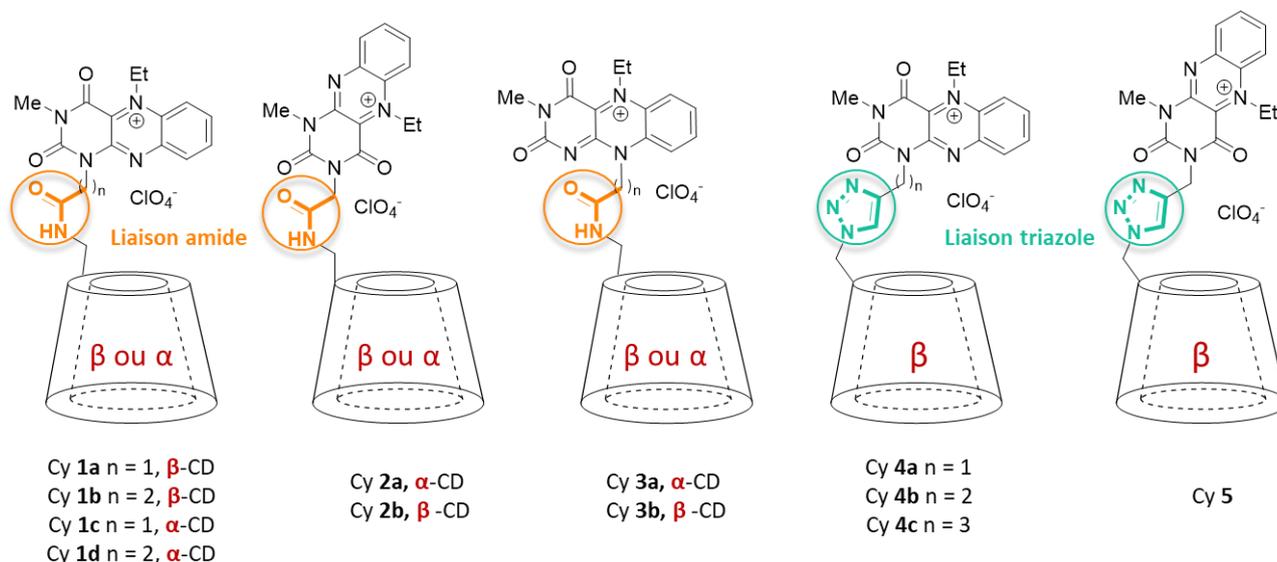


Figure 45 : Structures des catalyseurs flaviniques couplés à des cyclodextrines.<sup>[98-100]</sup>

Le dérivé **Cy 1a** présente les meilleurs résultats en catalyse avec des conversions quasiment quantitatives ( $> 90\%$ ) et des excès énantiomériques de 64% pour le thioanisole, 80% pour le méthyl-tolyl-thioéther, 91% pour le *tert*-Butyl-méthyl-thioéther et 78% pour le cyclohexyl-méthyl-thioéther. Les flavines conjuguées avec des  $\alpha$ -cyclodextrines conviennent mieux pour la sulfoxydation d'alkyl-méthyl-sulfures, alors que les  $\beta$ -cyclodextrines sont plus efficaces pour les sulfures d'aryles ou les sulfures d'alkyles encombrés. La fixation des groupements cyclodextrines sur la face supérieure des unités flaviniques ( $N_1$  ou  $N_{10}$ ) permet d'obtenir de meilleurs excès énantiomériques (**Cy 1** et **2** par rapport à **Cy 3**). La longueur de l'espaceur a très peu d'influence sur l'efficacité des catalyseurs, mais il est intéressant d'observer que cette longueur influence la configuration des produits obtenus pour les *n*-alkyl-méthyl-sulfures. Les énantiomères (+) sont obtenus avec des chaînes courtes (**Cy 1a-1c**), alors que les énantiomères (-) sont obtenus avec un espaceur plus long (**Cy 1b-1d-2b-3**) (Tableau 6).

Tableau 6 : : Excès énantiomériques obtenus pour la sulfoxydation de divers thioéthers catalysée par les différents conjugués flavine/cyclodextrines.

Substrats	CATALYSEURS							
	1a	1b	1c	1d	2a	2b	3a	3b
<i>n</i> -hexyl-S-Me	0	64/(-)	47/(+)	24/(-)	0	9/(-)	21/(-)	45/(-)
<i>n</i> -octyl-S-Me	18/(+)	29/(-)	70/(+)	17/(-)	0	0	30/(-)	42/(-)
<i>n</i> -decyl-S-Me	9/(+)	0	9/(+)	0	0	0	10/(-)	17/(-)
<i>t</i> Bu-S-Me	91/(-)	86/(-)	0	0	0	8/(-)	0	50/(-)
Cyclohexyl-S-Me	78/(-)	80/(-)	8/(+)	0	0	11/(-)	0	59/(-)
Bn-S-Me	30/(+)	58/(+)	0	0	0	8/(+)	0	37/(+)
Ph-S-Me	64/(+)	36/(+)	0	0	0	4/(+)	0	35/(+)
<i>p</i> -Tolyle-S-Me	80/(+)	69/(+)	-	-	0	0	0	51/(+)

Conditions : Substrat (0,1 mmol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,3 eq), catalyseur (1 mol%) dans un tampon phosphate à pH 7.5 (1-2) ou pH 2.9 (3)

Les résultats montrent que le remplacement de la liaison peptidique par un espaceur de type triazole influence négativement l'activité catalytique des dérivés. Il est probable que la formation de liaisons hydrogène plus aisée avec la fonction amide qu'avec le groupement triazole soit à l'origine de cette différence. En effet, les liaisons hydrogène pourraient augmenter la réactivité de la fonction hydroperoxyde de l'intermédiaire formé, ou encore influencer sur l'arrangement relatif des sous-unités flavine et cyclodextrine. Bien que ces composés flavine/cyclodextrine ne rivalisent pas encore avec des systèmes enzymatiques, ils constituent des catalyseurs biomimétiques prometteurs pour la sulfoxydation. Ils réalisent l'oxydation dans des temps relativement courts et tolèrent une concentration en substrat généralement élevée par comparaison aux enzymes. Cependant, un point majeur reste à améliorer pour ces catalyseurs flavine-cyclodextrine, c'est l'utilisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme oxydant. En effet, l'utilisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> engendre de l'oxydation non spécifique qui pourrait diminuer la stéréosélectivité globale de la réaction (Tableau 7).<sup>[100]</sup>

Enfin, tout comme les enzymes naturelles, qui à la suite d'une modification au niveau de leurs sites actifs peuvent perdre complètement leur activité, les catalyseurs flavine-cyclodextrine ont une forte sensibilité à de faibles modifications structurales et ce phénomène est actuellement à l'étude. Ceci peut être une des raisons pour lesquelles les auteurs ne se sont pas encore orientés vers d'autres

types de réactions (Baeyer-Villiger ou N-oxydation), préférant se consacrer uniquement aux sulfoxydations pour le moment.

Tableau 7 : Comparaison de l'activité catalytique des composés Cy 1a et 4a avec des enzymes pour des réactions de sulfoxydations.

Catalyseurs	[Substrat] (mM)	Temps de réaction	Conversion (%) / ee (%)			
			<i>n</i> -Bu-S-Me	Ph-S-Me	<i>p</i> -Tolyle-S-Me	<i>t</i> -Bu-S-Me
-	100	1h	97	2	4	98
Cy 1a (1 mol%)	120	1h	-	93 / 64	99 / 80	99 / 88
Cy 4a (5 mol%)	120	1h	quant / 50	36 / 26	38 / 20	quant / 30
HAPMO <sup>[101]*</sup>	10-20	24h	99 / 99	96 / 99	77 / 99	-
CHMO <sup>[102]*</sup>	35	1 nuit	-	88 / 99	94 / 37	98 / 99

Conditions : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,3 eq) dans un tampon phosphate (0,05 M) à pH 7,5 , 25 ° C, HAPMO : 4-hydroxyacetophenon monooxygénase de *Pseudomonas fluorescens* ACB, 1 U/mL, CHMO : Cyclohexanone monooxygénase de *Acinetobacter calcoaceticus*, 0,5 U/mL. \* Réaction avec O<sub>2</sub>.

Yashima et al. ont rapporté qu'un polymère optiquement actif, constitué quasiment en intégralité du cation 5-éthylflavinium dérivé de la riboflavine naturelle (Figure 46),<sup>[103]</sup> était capable de catalyser l'oxydation du *p*-tolyl-méthyl-thioéther et du 2 naphthyl-méthyl-thioéther avec du peroxyde d'hydrogène à - 40 °C dans le THF, avec des rendements d'environ 40% et des excès énantiomériques de 60 et 40% respectivement. L'augmentation de la température à -20 °C et 0 °C, permet d'augmenter le rendement de la réaction au détriment de l'excès énantiomérique (5,4 et 2,4%). Les mêmes réactions effectuées dans l'acétonitrile donnent de meilleurs rendements mais avec des excès énantiomériques nettement inférieurs (Tableau 8).

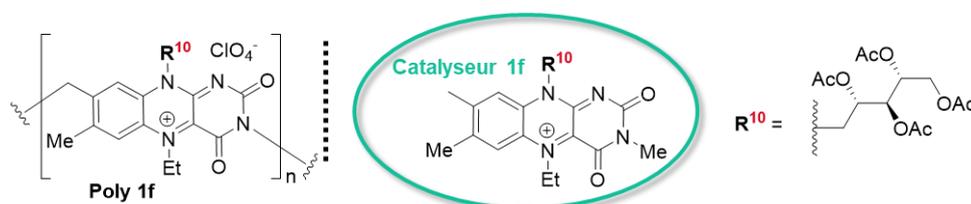


Figure 46 : Structure du catalyseur 1f et du polymère 1f.

Tableau 8 : Comparaison de l'activité catalytique du polymère poly **1f** et du catalyseur **1f** pour des réactions de sulfoxydation dans divers solvants.

Substrats	Catalyseur	Solvants	Rdt (%)	ee (%)
p-tolyle-S-Me	<b>Poly 1f (50 mol%)</b>	ACN	70	20 (S)
	<b>1f (50 mol%)</b>	ACN	62	11 (S)
	<b>Poly 1f</b>	THF	39	60 (S)
	<b>1f</b>	THF	28	30 (S)
2-naphtyle-S-Me	<b>Poly 1f</b>	THF	40	42 (S)
	<b>1f</b>	THF	22	28 (S)
2-Ph dithiane	<b>Poly 1f</b>	THF	66	13 (1R, 2R) (>99% de)
	<b>1f</b>	THF	61	2 (1R, 2R) (>99% de)

Condition : Substrat (0,1 M), catalyseur (5 mol%), and 30% aqueuse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans solvant à -40 °C sous N<sub>2</sub>.

L'explication proposée s'appuie sur la chiralité hélicoïdale du polymère **Poly 1f**, assistée par la chiralité de la chaîne tétraacétylribityle permettant d'obtenir un intermédiaire hydroperoxyflavine chiral. En se basant sur la configuration (S) des sulfoxydes obtenus, il a été proposé que cette structure hélicoïdale soit constituée des intermédiaires actifs qui s'arrangent afin de former un *Re-Re* « stacked duplex » sur lequel l'addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se fera du côté opposé formant ainsi le (S) hydroperoxyde. Celui-ci transfère ensuite un oxygène au sulfure aromatique en interaction de type  $\pi$ -stacking avec le cycle aromatique de la flavine. Fait intéressant, le catalyseur seul **1f** peut induire un peu de chiralité d'environ 30% pour les deux substrats grâce au groupement ribityle qui permet d'induire de la chiralité à l'hydroperoxyflavine intermédiaire (Figure 47).<sup>[103,104]</sup>

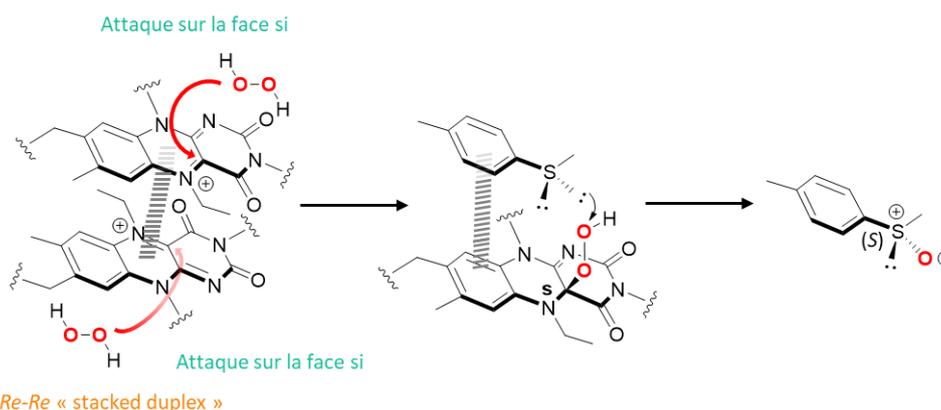
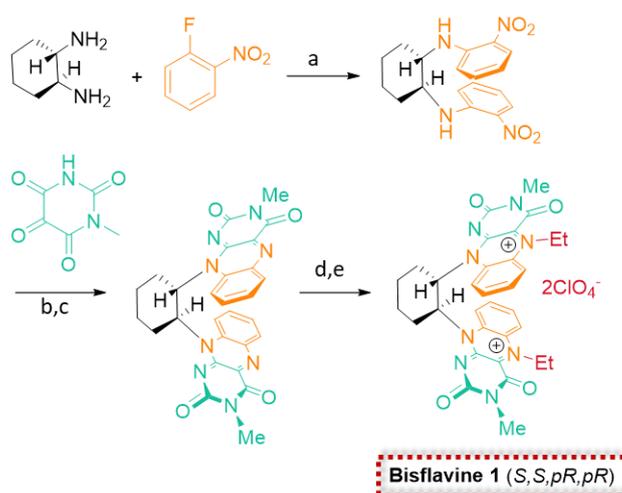


Figure 47 : Mécanisme proposé pour la sulfoxydation asymétrique du thioanisole par le catalyseur poly **1f** avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**b) Oxydation de Baeyer-Villiger asymétrique avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Comme décrit précédemment, les flavoenzymes peuvent également catalyser des oxydations de Baeyer-Villiger asymétriques. Ainsi, sur la base des résultats obtenus pour l'oxydation asymétrique des thioéthers par les flavines à « coiffe chirale »,<sup>[96]</sup> un catalyseur de type bisflavine a été élaboré par l'équipe de Murahashi en 2002.<sup>[105]</sup> Comparé aux flavines à coiffes chirales qui nécessitent une méthode de préparation fastidieuse, ce catalyseur est préparé en cinq étapes sans séparation HPLC, à partir de (S,S)-cyclohexane-1.2-diamine et du fluoronitrobenzène, suivi de la condensation avec l'alloxane. Seulement un stéréoisomère est formé en raison des restrictions rotatoires entre les deux flavines planes (Figure 48).



**Figure 48 : Synthèse de bisflavine 1 : a) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH, reflux, 36 h, 77%; b) H<sub>2</sub>, Pd/C, AcOH, température ambiante, 3 h; c) 3-methylalloxan, B(OH)<sub>3</sub>, AcOH, 10 h, 90%, d) CH<sub>3</sub>CHO, NaBH<sub>3</sub>CN, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, DMF, 60C, 3 h; e) HClO<sub>4</sub>, NaNO<sub>2</sub>, NaClO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 1 h, 80%.**

Les rendements et les excès énantiomériques obtenus avec ce catalyseur sont fortement dépendants du solvant. De ce fait, le rendement a été amélioré par l'utilisation de trifluoroéthanol. En ce qui concerne l'énantiosélectivité, l'ajout d'acétate de sodium permet de neutraliser l'acide perchlorique formé au cours du cycle catalytique, ce qui favorise l'oxydation non asymétrique. L'addition d'une faible proportion d'eau aide également pour l'énantiosélectivité en favorisant les interactions  $\pi$ - $\pi$  entre les cycles aromatiques du catalyseur et celui du substrat. L'oxydation de Baeyer-Villiger asymétrique des cyclobutanones en présence de 10 mol% de catalyseur, dans un mélange trifluoroéthanol/ méthanol/ eau (6/3/1), a ainsi permis d'obtenir les butyrolactones correspondantes avec des rendements allant de 28 à 67% et avec des excès énantiomériques de 61-67% à - 30 °C après six jours de réaction. Jusqu'à 74% d'excès énantiomérique a notamment pu être

obtenu à - 50 °C pour l'oxydation de la 3- (4-fluorophényl) cyclobutanone. L'empilement  $\pi$ - $\pi$  dirige l'orientation de l'attaque nucléophile de l'hydroperoxyde sur le groupement carbonyle du côté opposé au groupement phényle formant préférentiellement les (*S*) lactones avec le substrat (*S,S* *pR*, *pR*), alors que les (*R*) lactones peuvent être obtenues avec le substrat (*R,R*, *pS*,*pS*) (Figure 49).

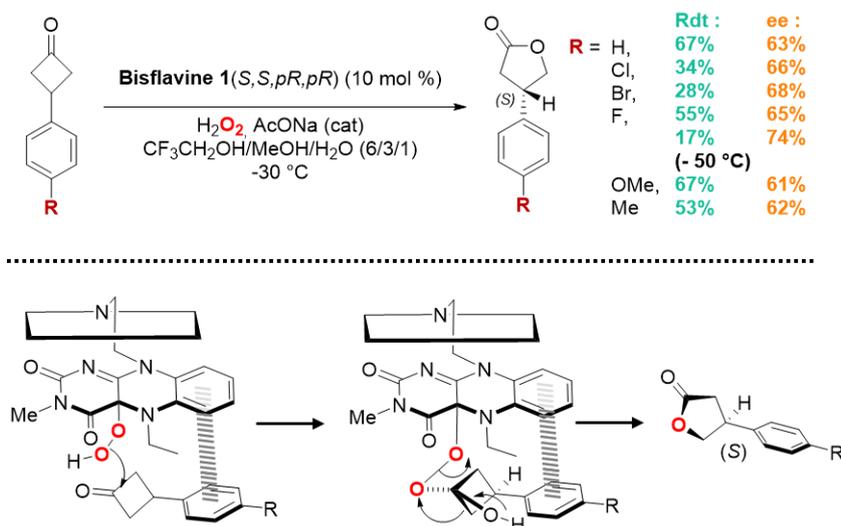


Figure 49 : Mécanisme proposé pour la catalyse d'oxydation de Baeyer-Villiger asymétrique utilisant la Bisflavine 1 avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Récemment, Yamamoto et al. ont mis au point un catalyseur généré par l'assemblage d'un sel de flavinium chiral et d'un dimère d'alcaloïde permettant d'effectuer des réactions asymétriques de type BV avec de très bons rendements. L'association ionique entre la flavine et le dimère permet à la fois de renforcer l'activité catalytique ainsi que la stéréosélectivité. Après avoir optimisé les conditions réactionnelles (solvants, bases, flavines), ce système catalytique permet l'oxydation de cyclobutanones substituées en position 3 avec de bons rendements et des énantiosélectivités bonnes à excellentes (jusqu'à 98:2 e.r. (« enantiomeric ratio »)). Ces travaux représentent le premier exemple d'auto-assemblage entre un dérivé flavinique et une base pour former un site de réaction chiral rappelant la chiralité trouvée au sein des sites actifs enzymatiques (Figure 50).<sup>[87]</sup>

## Chapitre 1 : Introduction Bibliographique

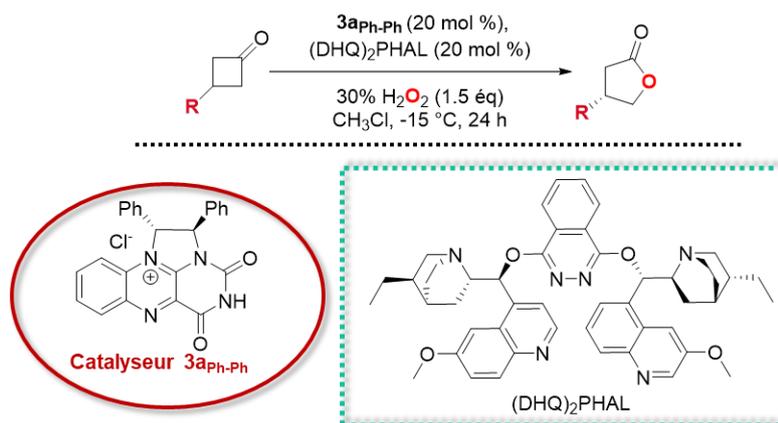


Figure 50 : Réaction de Baeyer-Villiger asymétrique avec le catalyseur 3a<sub>Ph-Ph</sub>.

Tableau 9 : Réactions d'oxydation de Baeyer-Villiger asymétrique sur diverses cyclobutanones substituées catalysée par 3a<sub>Ph-Ph</sub>.

R =	Conversion (%)	Rdt (%)	er [S/R]
Phényle	97	87	95 : 5
1-Naphtyle	92	92	97 : 3
BnOCH <sub>2</sub> -	89	85	82 : 18
BnOOC-	70	58	11 : 89
BocNH-	100	92	2 : 98
Cyclohexyle	86	85	67 : 33
tert-Butyle	-	80	57 : 43

Conditions : Substrat = 100 mM; 3a<sub>Ph-Ph</sub> = 20 mM; (DHQ)<sub>2</sub> PHAL = 20 mM; CHCl<sub>3</sub> (1 mL); -15 °C; 24 h.

La sélectivité pour cette réaction peut être expliquée à partir de l'état de transition qui se forme au cours de la réaction. Initialement, le sel de flavine se lie de chaque côté du dimère avec une orientation sélective définie par des interactions ioniques et  $\pi$ . Il est à noter qu'il n'y a aucun encombrement stérique entre le groupe phényle proche de N<sub>1</sub> et le groupe éthyle de (DHQ)<sub>2</sub>PHAL. Par la suite, l'autre base déprotone le peroxyde d'hydrogène, qui réagit avec l'iminium pour former l'hydroperoxyde de flavine. Ce dernier attaque le côté le moins encombré du substrat (éventuellement activé par liaison hydrogène avec de l'ammonium), formant l'intermédiaire de Criegee qui se réarrange pour donner le produit attendu (Figure 51).

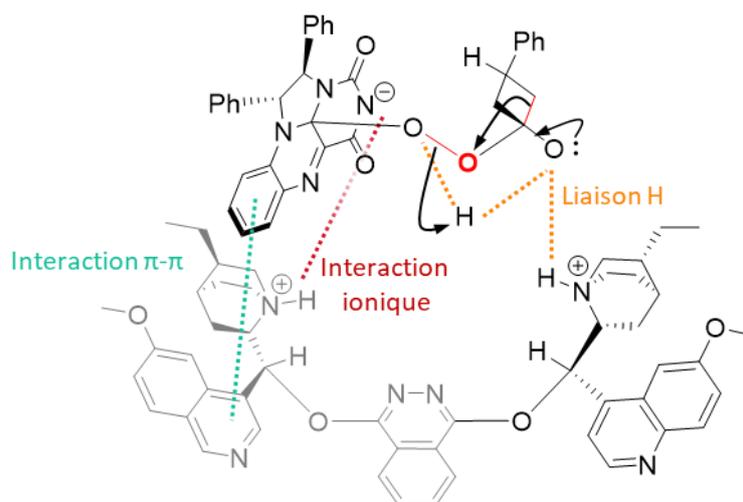


Figure 51 : Etat de transition pour l'oxydation de type Baeyer-Villiger avec le catalyseur  $3a_{Ph-Ph}$  et  $(DHQ)_2PHAL$ .

Pour résumer, un grand nombre de catalyseurs flaviniques ont été synthétisés pour mimer l'activité des flavoenzymes : les sels d'isoalloxaziniums et d'alloxaziniums, les flaviniums  $N_1.N_{10}$  pontés, les flavines neutres d'isoalloxazines et également des flavines chirales. Ces catalyseurs ont permis d'oxyder différents substrats (sulfures, cétones et amines) avec de très bons rendements. En revanche, ces systèmes présentent encore des inconvénients majeurs par rapport aux systèmes biologiques qui sont notamment l'utilisation de solvants organiques et la nécessité d'utiliser le peroxyde d'hydrogène comme oxydant. Le développement de catalyseurs éco-compatibles, inspirés des systèmes biologiques, nécessite donc encore une évolution importante afin de permettre l'utilisation de  $O_2$  à la place de  $H_2O_2$  et afin de réaliser les réactions dans l'eau, en absence totale de solvants organiques.

#### 4. Réactions d'oxydations catalysées par des dérivés flaviniques avec $O_2$ .

Les travaux décrits ci-dessus, ont permis de réaliser des réactions d'oxydations (sulfoxydation, N-oxydation et Baeyer-Villiger) avec de très bons rendements à l'aide de flavines modifiées mais en utilisant  $H_2O_2$ . Ainsi, l'étape suivante afin de se rapprocher toujours un peu plus des processus biologiques est de concevoir des systèmes catalytiques utilisant directement l'oxygène moléculaire, en remplacement du peroxyde d'hydrogène. L'utilisation de  $H_2O_2$  permet l'oxydation directe du sel de flavinium en hydroperoxyflavine (« shunt process »). En se privant de  $H_2O_2$  au profit de  $O_2$ , une nouvelle étape cruciale entre en jeu, la réduction des sels de flaviniums (Figure 52). Comme décrit

plus tôt, l'oxydation des flavines réduites en solution par l'oxygène se produit facilement pour former l'hydroperoxyde correspondant. Par conséquent, l'étape cruciale devient la réduction de la flavine ou du sel de flavinium avec un réducteur adéquat (NADH ou NADPH dans le cas des enzymes).<sup>[106]</sup>

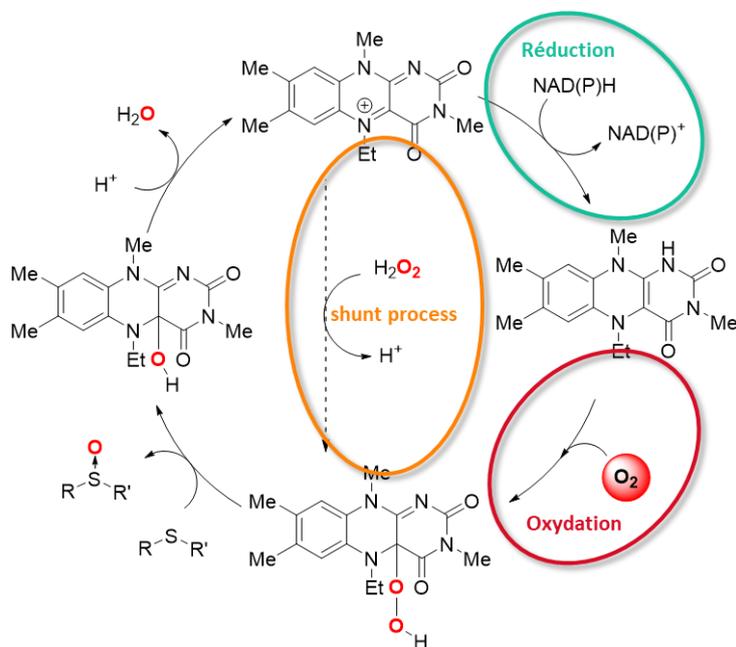


Figure 52 : Cycle catalytique proposé pour l'oxydation du thioanisole par la flavine 1a avec O<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (shunt process).

#### a) Sulfoxydations catalysées par des dérivés flaviniques avec O<sub>2</sub>

La première réaction catalysée par une flavine et de l'oxygène moléculaire a été décrite par Murahashi en 2003. En se basant sur le fait que les dérivés d'hydrazines sont de bons inhibiteurs de flavoenzymes en réagissant sur la position C<sub>4a</sub> des flavines, et sachant que ce sont également de bons réducteurs, Murahashi les a donc utilisés comme réducteurs pour réaliser l'oxydation de sulfures en sulfoxydes et d'amines en N-oxydes dans le trifluoroéthanol (TFE) avec de très bons rendements et avec comme seuls sous-produits de l'eau et du diazote. Les réactions sont chimiosélectives et sans suroxydation des sulfures en sulfones. L'efficacité de la réaction est très élevée, un TON de 19 000 est atteint pour l'oxydation de *p*-tolyl-méthyl-thioéther avec une charge catalytique de 0,005 mol% (Figure 53).<sup>[76]</sup>

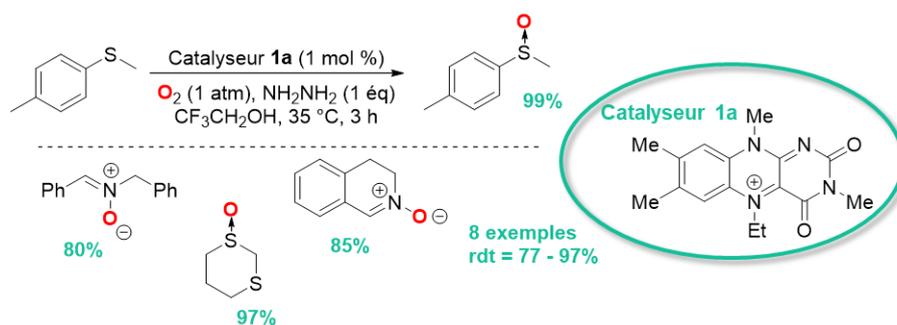


Figure 53 : Oxydation avec l'oxygène moléculaire et le catalyseur 1a.

Une analyse précise a montré que 0,5 équivalent d'hydrazine pour un équivalent d'oxygène moléculaire était nécessaires pour l'oxydation. En effet, le cycle catalytique (Figure 54) indique qu'après l'étape d'élimination d'eau, le sel de flavinium, peut être réduit par l'hydrate d'hydrazine pour donner du FIET<sub>H</sub> en passant par un adduit (FIETNHNH<sub>2</sub>), qui subit ensuite une  $\beta$ -élimination donnant du diimide, également capable de réagir avec une nouvelle flavine oxydée pour donner une flavine réduite et de l'azote moléculaire. La FIET<sub>H</sub> ainsi formée réagit avec l'oxygène moléculaire pour former l'espèce active et compléter le cycle catalytique.

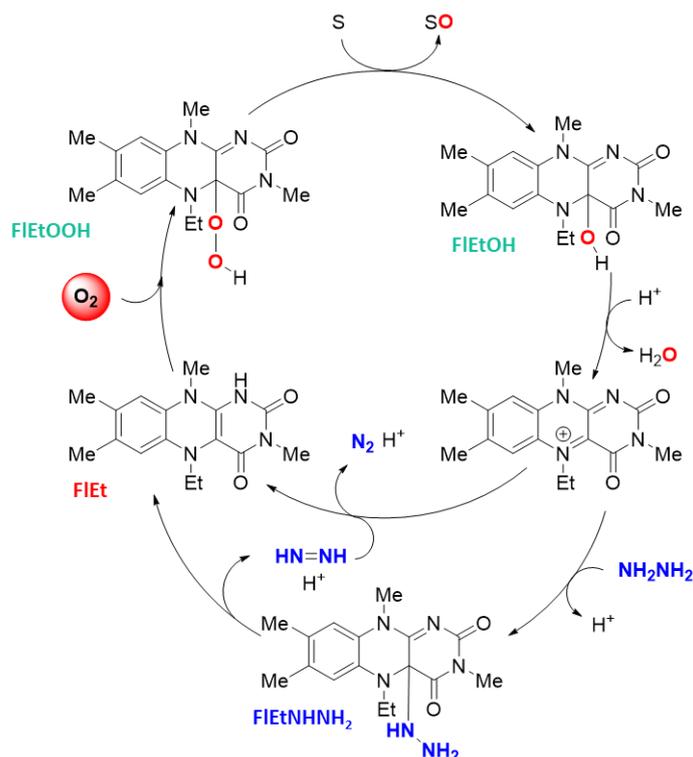


Figure 54 : Mécanisme proposé pour les réactions d'oxydations catalysées par **1a** en utilisant O<sub>2</sub> et NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.<sup>[83]</sup>

Au vu des résultats publiés dans la littérature, il semble que le trifluoroéthanol (TFE) joue un rôle important dans le système catalytique impliquant l'hydrazine comme source d'électron. Il a en effet été démontré que la réaction ne se faisait quasiment pas lorsque le TFE était remplacé par le méthanol ou le *t*-butanol en raison de l'attaque nucléophile de l'hydrazine sur l'hydroperoxyflavine, alors que, l'utilisation de solvant alcoolique acide (TFE ou HFIP : hexafluoroisopropanol) favorise la réaction entre le sulfure et l'espèce active en raison de la désactivation de l'hydrazine par liaison hydrogène.<sup>[107]</sup>

Tableau 10 : Effet de solvant pour l'oxydation du *p*-tolyle méthyle thioéther avec **1a**.

Solvant	Temps (h)	Rdt (%)
HFIP	96	96
TFE	9	97
MeOH	96	33
<i>i</i> PrOH	96	14
<i>t</i> BuOH	40	nr

Conditions : **1a** (1 mol%), NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (0,5 eq)

La volonté de trouver de nouvelles procédures peu coûteuses et compatibles avec un large éventail de substrats, a également conduit à chercher de nouveaux agents réducteurs en remplacement de l'hydrate d'hydrazine, qui nécessite l'utilisation d'alcools fluorés coûteux et qui ne tolère pas la présence de fonctions carbonyle (Figure 55).<sup>[49,50]</sup> Ainsi, la poudre de zinc a été utilisée comme agent réducteur pour des oxydations de type Baeyer-Villiger de cyclobutanones.<sup>[108]</sup> Foss et al. ont également rapporté que l'oxydation catalytique d'aldéhydes phénoliques avec de l'oxygène moléculaire en présence d'ester de Hantzsch donnait des catéchols de manière extrêmement efficace.<sup>[49]</sup>

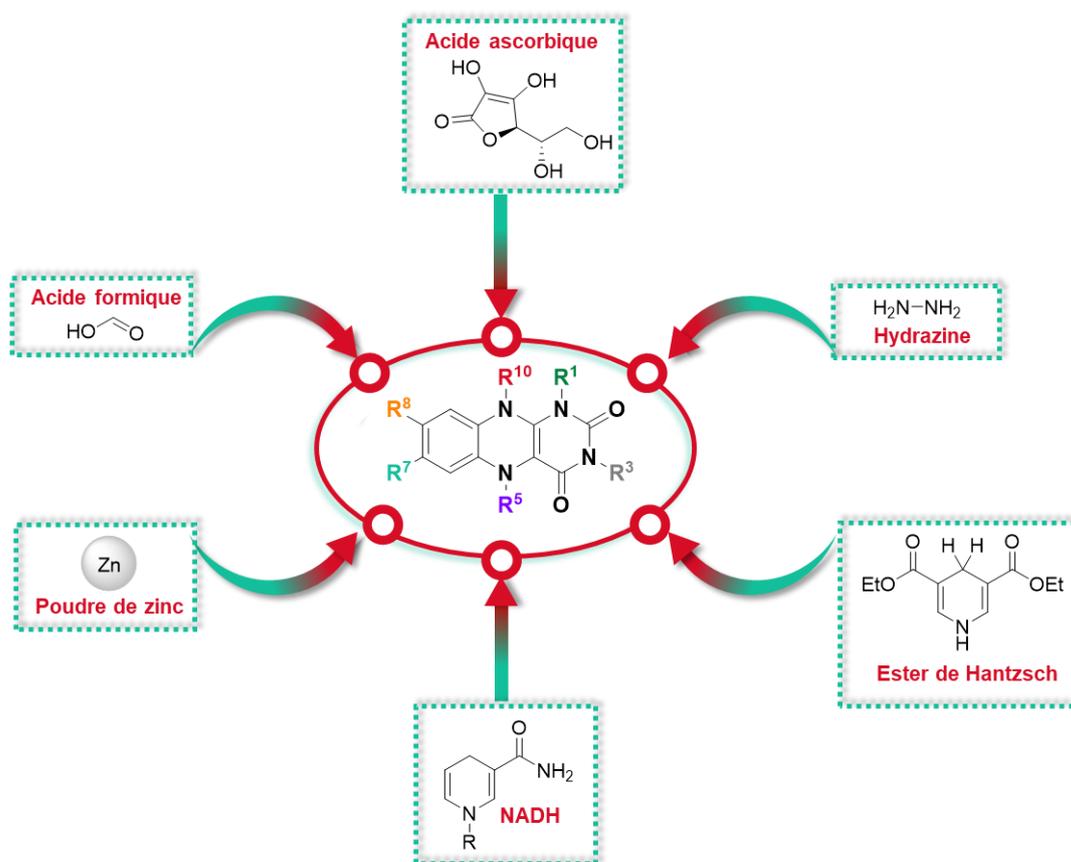


Figure 55 : Réducteurs sacrificiels utilisés pour les réactions d'oxydation catalysées par une flavine et O<sub>2</sub>.

En 2013, Imada et al. ont mis au point une méthode plus respectueuse pour l'environnement permettant d'effectuer des sulfoxydations avec de très bons rendements, dans l'eau en milieu tamponné et en utilisant le dioxygène et l'acide ascorbique comme réducteur (Figure 56).<sup>[109]</sup>

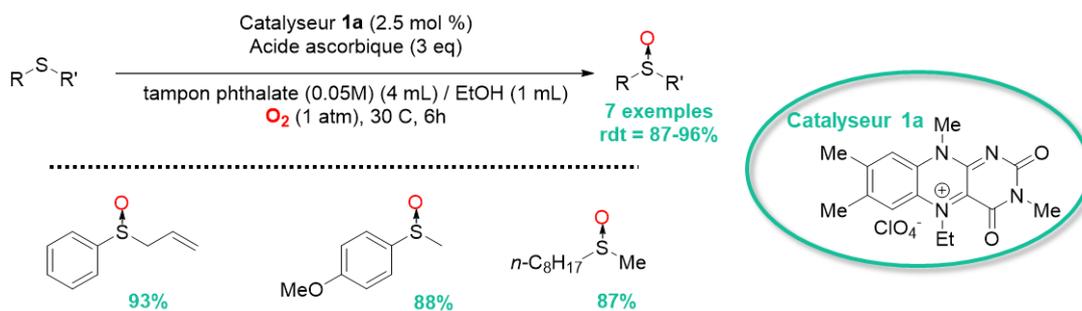


Figure 56 : Catalyse de sulfoxydation avec le catalyseur 1a et l'acide ascorbique.

Dans ce cas, la flavine est réduite à un électron par l'ascorbate de sodium pour donner un intermédiaire flavine semiquinone anionique, qui est ensuite réduite à un électron par un second anion ascorbate. Ainsi, deux équivalents d'acide ascorbique sont nécessaires dans ce système catalytique, en raison de la faible capacité réductrice du radical ascorbyle (AH<sup>•</sup>) formé. La suite du cycle catalytique est similaire au cycle déjà décrit précédemment. De plus, les auteurs ont rapporté que le système était dépendant au pH. En effet, en solution aqueuse, l'acide ascorbique est en équilibre entre trois espèces : la forme neutre (AH<sub>2</sub>), mono-anionique (AH<sup>-</sup>) et dianionique (A<sup>2-</sup>) (Figure 57). D'autre part, c'est AH<sub>2</sub> qui possède l'activité réductrice la moins importante. Ainsi, dans des conditions acides, inférieures au pKa<sub>1</sub>, l'acide ascorbique complètement protoné est majoritaire en solution et ne peut réduire la flavine, inhibant totalement la réaction. En revanche, dans des conditions moins acides, l'espèce AH<sup>-</sup> permet la réduction de la flavine et le cycle catalytique peut avoir lieu (Tableau 11).

Tableau 11 : Influence du tampon et du pH sur l'oxydation du Méthyl-p-tolyl-thioéther catalysée par 1a avec l'acide ascorbique.

Tampon	pH	Rdt (%)
Sans	2,0	0
Citrate	3,3	0
Phtalate	4,0	81 (99) <sup>a</sup>
Acétate	5,0	47
Phosphate	7,4	29

a) Avec 20% d'éthanol

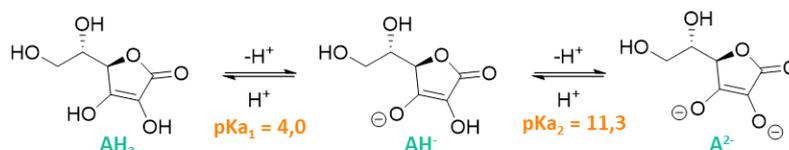


Figure 57 : Différentes forme acide/base de l'acide ascorbique : neutre (AH<sub>2</sub>), mono-anionique (AH<sup>-</sup>) et dianionique (A<sup>2-</sup>).

L'acide formique s'est avéré être également un excellent réducteur pour l'oxydation de sulfures avec l'oxygène moléculaire et le sel d'isoalloxazinium **1c**. Les conditions réactionnelles mises au point par Murahashi, impliquant l'utilisation d'un mélange d'acide formique et de triméthylamine (8: 1), du catalyseur **1c** dans ACN en présence d'oxygène moléculaire (1 atm) à 60 ° C, ont permis d'oxyder des sulfures en sulfoxydes avec d'excellents rendements (Figure 58). De plus, le système catalytique s'avère sélectif pour l'oxydation des thioéthers même en présence d'amine tertiaire ou d'oléfine au sein du substrat. Par ailleurs, aucun produit de suroxydation n'a été détecté. D'un point de vue mécanistique, le sel de flavinium FIET<sup>+</sup> est réduit en flavine par l'acide formique avec libération de dioxyde de carbone.<sup>[51]</sup>

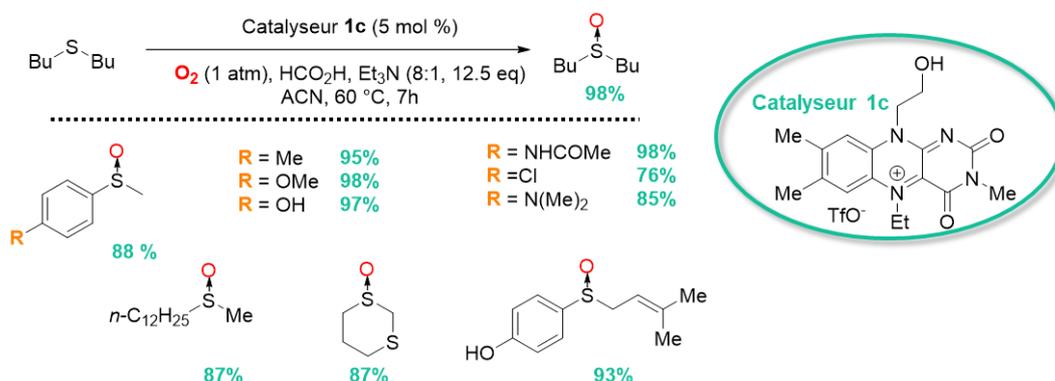


Figure 58 : Sulfoxydation catalysée par **1c** en présence d'acide formique / Et<sub>3</sub>N et de O<sub>2</sub> comme oxydant.<sup>[51]</sup>

### b) Réactions de Baeyer-Villiger catalysées par des dérivés flaviniques avec O<sub>2</sub>

Imada et al. ont montré pour la première fois en 2005 que la catalyse avec des flavines pour réaliser l'oxydation de Baeyer-Villiger en utilisant du dioxygène était possible avec du zinc comme réducteur. Dans ce cas, les cétones sont mises en présence de 2 mol% de catalyseur et de la poudre de zinc dans un mélange acétonitrile/acétate d'éthyle/eau (8/1/1) sous oxygène à 60 °C. Les lactones

sont obtenues avec des rendements supérieurs à 80% et peuvent être isolées simplement par filtration suivie d'une extraction (Figure 59).<sup>[108]</sup>

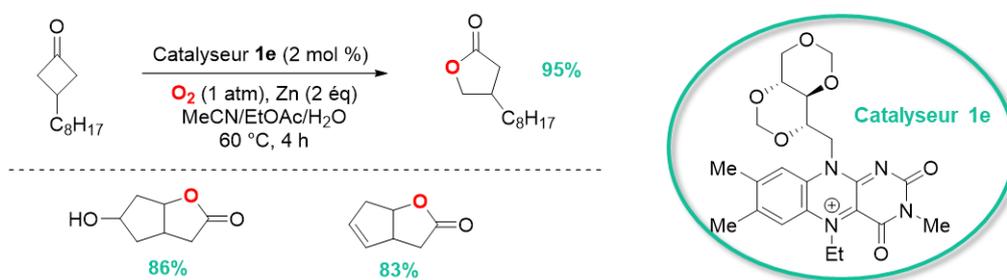


Figure 59 : Sulfoxydation catalysée par 1c en présence de poudre de zinc et avec O<sub>2</sub>.<sup>[108]</sup>

De plus, la chimiosélectivité entre les cétones, les sulfures et les alcènes est claire. L'utilisation du catalyseur **1e** pour une réaction équimolaire avec la 3-(2-naphthyl)cyclobutanone et le méthyl-*p*-tolyl-thioéther ou le cyclooctène conduit à la lactone correspondante avec une sélectivité extraordinairement élevée. Ce résultat contraste avec les réactions utilisant le *m*CPBA, qui conduisent soit à un mélange de sulfoxyde et de sulfone dans le cas des thioéthers, soit à un mélange d'époxyde et de lactone dans le cas du cyclooctène. Il faut également noter que l'oxydation catalytique avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> donne majoritairement le produit de la sulfoxydation (Figure 60).

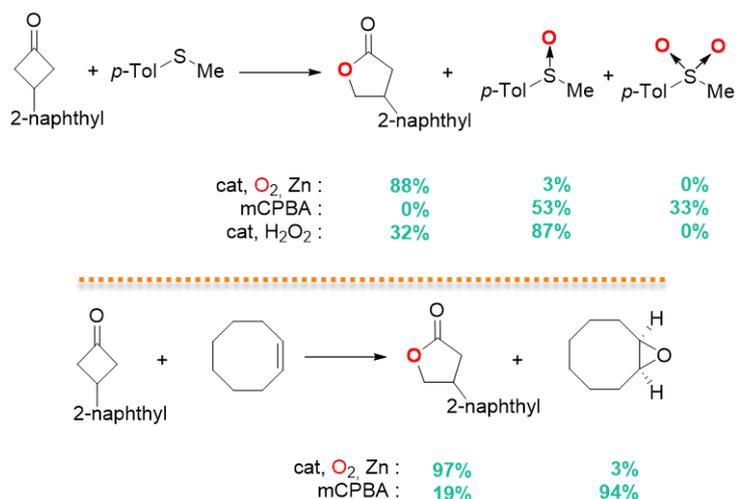


Figure 60 : Compétition entre les réactions de Baeyer-Villiger de Sulfoxydation et d'époxydation en présence du catalyseur **1e** en fonction de l'oxydant utilisé.

Les résultats obtenus précédemment peuvent être rationalisés à l'aide du cycle catalytique (Figure 61). Le sel de flavinium est d'abord réduit à deux électrons par le zinc pour donner la flavine réduite anionique.<sup>[26,110]</sup> L'oxygène moléculaire réagit ensuite avec la flavine réduite pour former l'intermédiaire actif : la peroxyflavine, qui oxyde la cétone en lactone correspondante. L'oxydation de Baeyer-Villiger chimiosélective peut être attribuée au caractère hautement nucléophile de l'intermédiaire anionique qui n'est pas favorable aux réactions électrophiles telles que la sulfoxydation et l'époxydation (Figure 61).

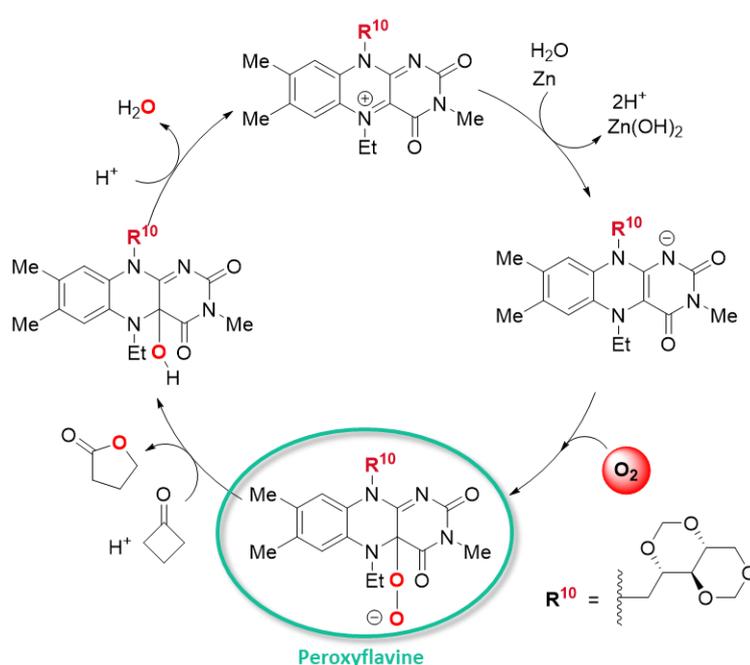


Figure 61 : Cycle catalytique pour la réaction de Baeyer-Villiger catalysée avec 1e et de la poudre de zinc.

Récemment, l'équipe d'Imada a présenté les premières réactions d'oxygénation catalysées par une flavine non modifiée en position N<sub>5</sub> dans des conditions non enzymatiques. Pour débloquent ce verrou scientifique, une flavine substituée en position N<sub>3</sub> par une chaîne peptidique a été envisagée. La conception de ce catalyseur a été réalisée en respectant les choix suivants : la chaîne peptidique doit être reliée à la position N<sub>3</sub> de la flavine. La flavine de départ doit être facilement disponible et incorporée à l'extrémité N-terminale du peptide. En ce qui concerne le peptide, un di ou tripeptide est envisagé avec des acides aminés peu coûteux. La L-proline doit être placée en position AA1 pour orienter les autres acides aminés afin qu'ils puissent être spatialement proches de

la position C4a et ainsi stabiliser l'(hydro)peroxo via des liaisons hydrogènes. En respectant ces règles, plusieurs catalyseurs ont été synthétisés (Figure 62).<sup>[111]</sup> La synthèse de ces catalyseurs a été réalisée par synthèse peptidique sur support solide selon une stratégie Fmoc / tBu et en utilisant un support de type polystyrène fonctionnalisée par des amines (NH<sub>2</sub>-PS).

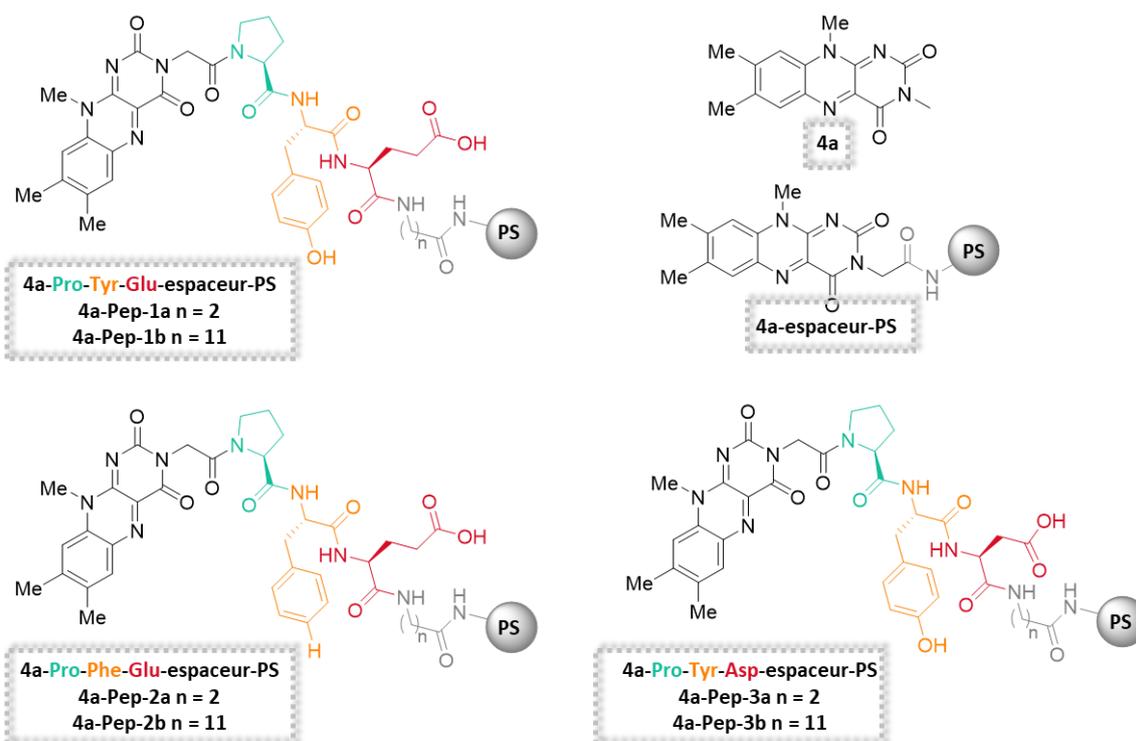


Figure 62 : Structure de divers flavopeptides synthétisés ( PS = polystyrène).<sup>[111]</sup>

Ces catalyseurs ont par la suite été utilisés pour la sulfoxydation du thioanisole afin de déterminer la meilleure conformation pour ces flavopeptides. De plus, des calculs de DFT (*Density Functional Theory*) ont permis de mettre en évidence les conformations les plus basses en énergie pour les intermédiaires de type (hydro)peroxyflavine. Suite à ces études, le catalyseur **4a-Pep-3b** s'est avéré être particulièrement efficace pour la réaction de sulfoxydation.

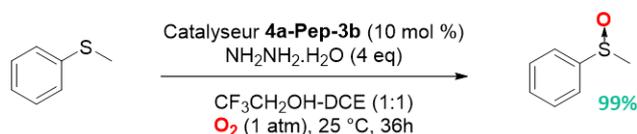


Figure 63 : Sulfoxydation du thioanisole avec le flavopeptide **4a-Pep-3b**.

Suite aux résultats obtenus pour la réaction de sulfoxydation, le catalyseur **4a-Pep-3b** a été utilisé pour réaliser la réaction de Baeyer-Villiger en s'inspirant des conditions réactionnelles mises en place en 2005,<sup>[108]</sup> qui était jusqu'alors l'unique exemple d'une oxydation de type Baeyer-Villiger catalysé par une flavine utilisant le dioxygène. L'oxydation de la 3-phényl-cyclobutanone a ainsi été réalisée en douceur en présence de 5 mol% de **4a-Pep-3b**, 20 équivalents de H<sub>2</sub>O, de poudre de zinc et de O<sub>2</sub> (1 atm) dans un mélange de solvants ACN/toluène/acétate d'éthyle (8/4/1) avec un très bon rendement. L'éthanol peut être utilisé à la place de l'acétonitrile comme co-solvant hydrophile. En revanche, le toluène est crucial en tant que co-solvant hydrophobe pour imbiber correctement la résine de polystyrène. Par ailleurs, lorsque le substrat présente une fonction alcène ou sulfure, l'oxydation est sélective et la lactone est produite quasiment exclusivement (Figure 64). Par contre, si **4a** ou **4a-espaceur-PS** sont utilisés à la place du catalyseur peptidique **4a-Pep-3b**, la réaction est totalement inhibée (rendement < 1%).

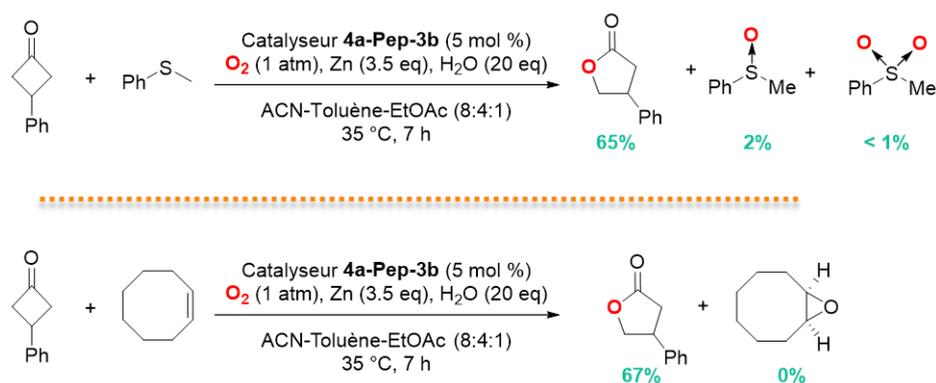


Figure 64 : réaction de Baeyer-Villiger du 3-phényl cyclobutanone avec le flavopeptide **4a-Pep-3b**.

Il semble ici que les cycles catalytiques soient similaires à ceux décrits précédemment, que ce soit pour la sulfoxydation (Figure 54) ou la réaction de Baeyer-Villiger (Figure 61). En revanche, les résultats expérimentaux décrits ci-dessus, ainsi que les calculs de DFT, suggèrent une forte participation de la chaîne peptidique pour la stabilisation de l'intermédiaire (hydro)peroxo, ainsi qu'une possible activation de la cétone grâce à un réseau de liaisons hydrogènes (Figure 65).

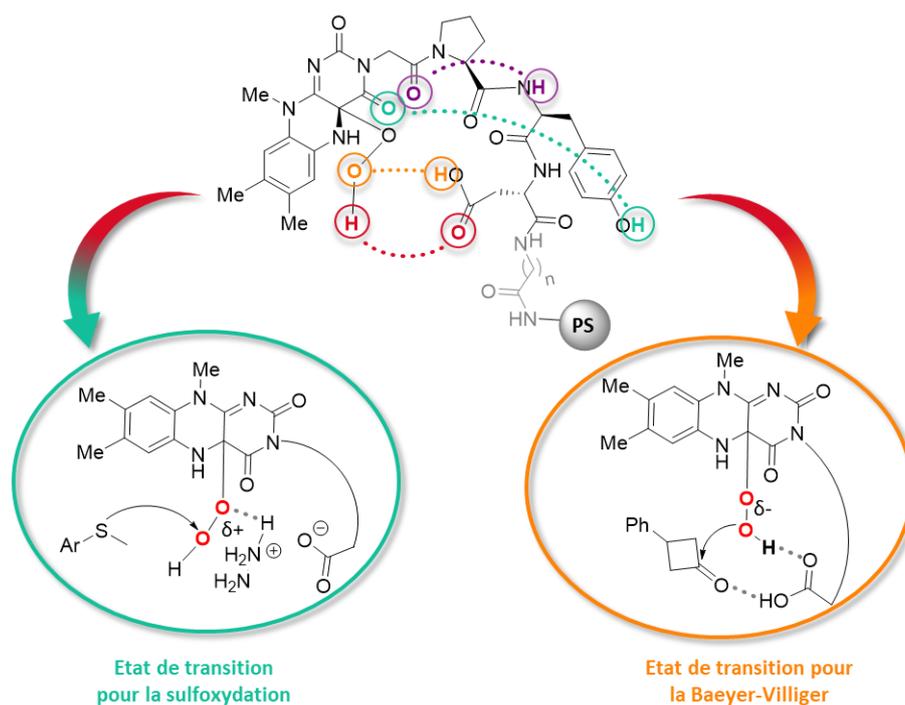


Figure 65 : Etats de transition pour les réactions de sulfoxydation et de Baeyer-Villiger catalysés par 4a-Pep-3b.

Bien que les dérivés flaviniques soient parmi les candidats les plus prometteurs en tant que catalyseurs d'oxydation, ils ont été peu utilisés pour la chimie de synthèse, que ce soit en laboratoire ou dans l'industrie, probablement en raison de leur complexité de préparation. Récemment, l'équipe d'Imada a mis au point une nouvelle méthode de synthèse plus sûre et sans danger pour l'environnement, avec **1a<sub>OH</sub>** préparé à partir de la 3,7,8,10-tétraméthylisoalloxazine comme catalyseur (Figure 31)<sup>[83]</sup>. Cette nouvelle méthode a permis de supprimer l'utilisation de produit chimique coûteux et à risque pour l'homme et/ou l'environnement (NaNO<sub>2</sub>, HClO<sub>4</sub>, NaClO<sub>4</sub>), le travail dans des conditions inertes ainsi que l'obligation d'isoler les produits intermédiaires. De plus, ce catalyseur s'est montré efficace pour la catalyse d'oxydation de Baeyer–Villiger, ainsi que pour la sulfoxydation avec de l'oxygène moléculaire en tant qu'oxydant terminal dans des conditions appropriées (Figure 66).<sup>[83]</sup>

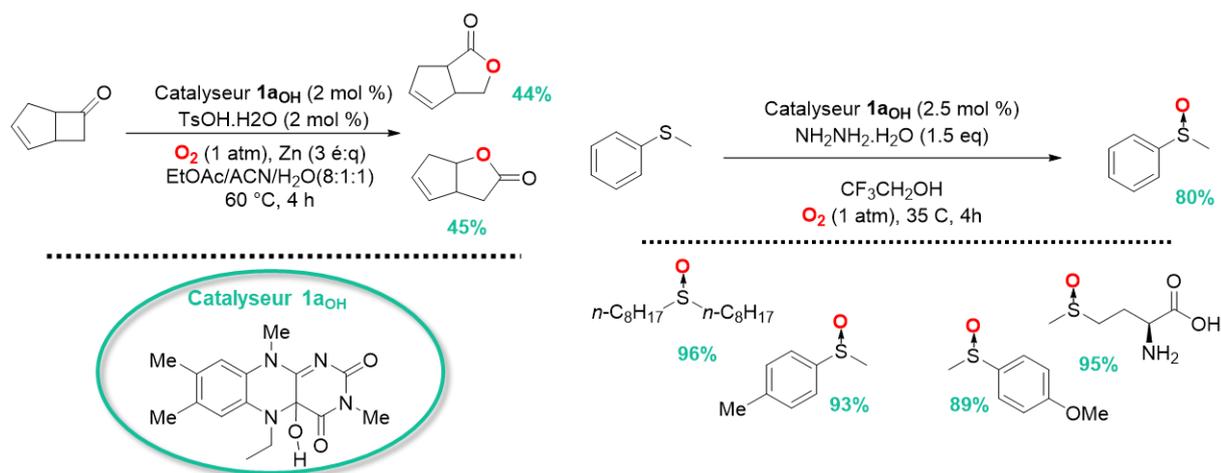


Figure 66 : Catalyses d'oxydation de Baeyer-Villiger et de sulfoxydation avec le catalyseur **1a<sub>OH</sub>** et O<sub>2</sub>.

### 5. Réaction d'oxydation catalysée par une flavine dans l'eau avec O<sub>2</sub>.

Suite aux travaux décrits ci-dessus, le défi actuel est de développer un système capable d'oxyder divers substrats à l'aide d'une **flavine non modifiée**, de préférence **dans l'eau** et en utilisant directement le **dioxygène de l'air**. Aucun système n'est encore capable de réunir tous ces critères. Cependant en 2015, Yoann Roux a développé au laboratoire, un système capable de reproduire l'activité réductase des flavoprotéines, grâce à un catalyseur macromoléculaire composé d'une FMN incorporée au sein de l'environnement localement hydrophobe d'un polymère hydrosoluble. Ce système s'est avéré capable de collecter efficacement les électrons du NADH grâce à son cofacteur flavinique, puis de fournir un flux mono-électrique vers un cofacteur redox tel qu'une porphyrine de manganèse. Une fois réduite, la porphyrine de manganèse (II) pouvait alors catalyser la réaction de sulfoxydation du thioanisole dans l'eau, à température ambiante et en utilisant le dioxygène comme source d'oxygène avec un rendement de 25%. Ce résultat extrêmement original constitue le premier exemple d'une hémoprotéine artificielle capable, comme les cytochromes P450, de catalyser l'oxydation de substrats en utilisant O<sub>2</sub> en milieu aqueux, dans des conditions douces de pression et de température.<sup>[6]</sup>

Suite à cette étude est née le projet consistant à utiliser cette même flavo-enzyme artificielle, non plus pour réduire un cofacteur métallique et ensuite activer le dioxygène, mais pour activer directement le dioxygène grâce à son cofacteur FMN et ainsi catalyser des réactions d'oxydations de type Baeyer-Villiger, sulfoxydations ou époxydations, dans l'eau et à pression atmosphérique et

température ambiante comme le font les Baeyer-Villiger monooxygénases (BVMO). Ce projet constitue l'essentiel du sujet de ma thèse.

Par ailleurs, il a été envisagé, en collaboration avec le Laboratoire d'Innovation Moléculaire et Applications de Mulhouse dirigé par le Professeur **Jean-Philippe GODDARD**, d'utiliser le flux d'électrons généré par la réductase artificielle, de façon à catalyser des réactions radicalaires dans l'eau. Ce travail a principalement été réalisé par la doctorante **Yvette LOCK TOY KI** sous la direction du Professeur **Jean-Philippe GODDARD** et le Docteur **Didier Le NOUEN** (Figure 67) à Mulhouse.

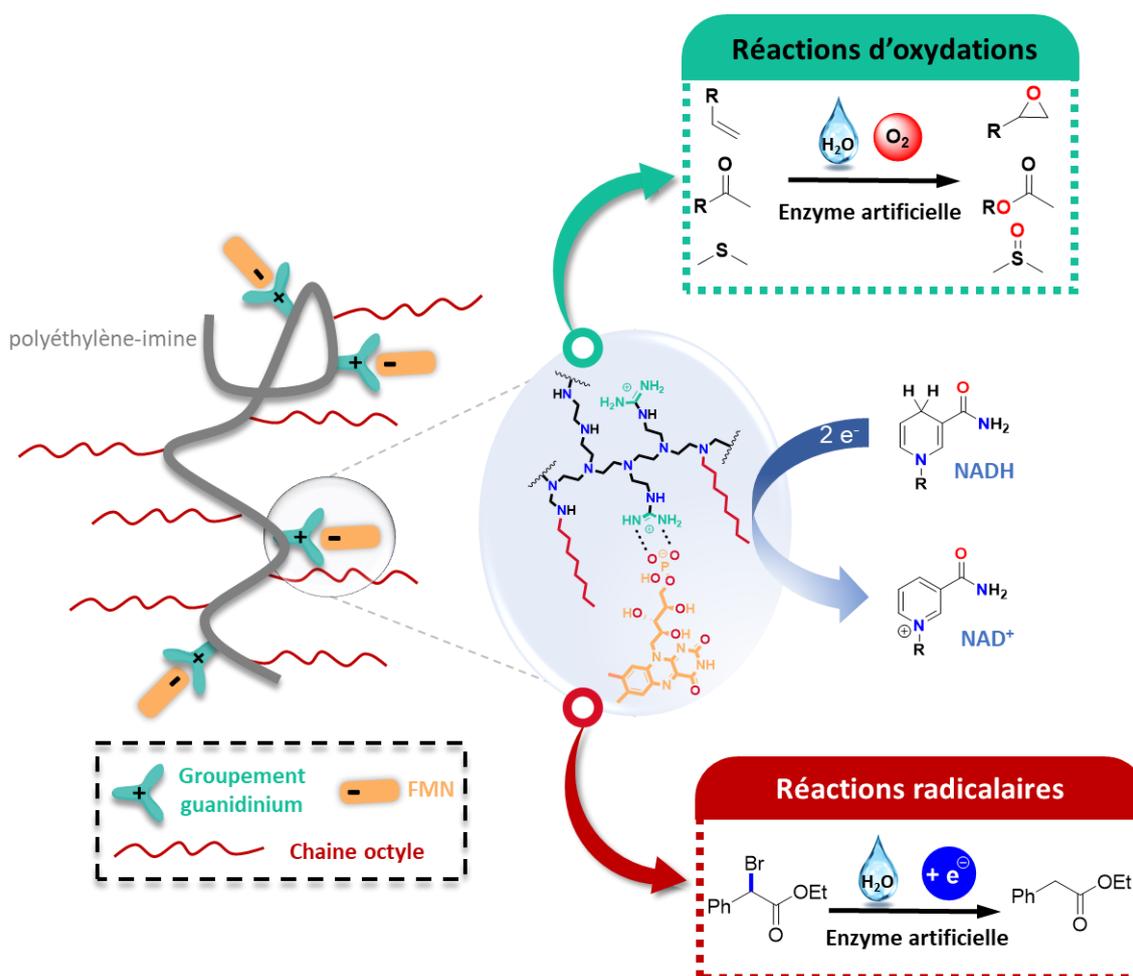


Figure 67 : Objectifs du projet de thèse : Réactions d'oxydation en présence de dioxygène et réactions radicalaires en condition anaérobie

## **Chapitre 2 : Fonctionnalisation et caractérisation des différents polymères**

Ce Chapitre regroupe la synthèse et la caractérisation par spectroscopie RMN des polymères bi et trifonctionnalisés, ainsi que celle d'un polymère chiral. La caractérisation par spectroscopie RMN permettra de déterminer à la fois les taux de greffages des différents substituants ainsi que la concentration en polymère de la solution. Ces polymères seront utilisés par la suite pour l'assemblage de l'enzyme artificielle au **chapitre 3**.

### **I. Fonctionnalisation du polymère.**

De l'automobile à l'aéronautique, de l'électroménager à la chimie pharmaceutique ou encore dans la télécommunication, les polymères sont de nos jours omniprésents dans une grande variété de secteurs, grâce à la diversité de leurs propriétés physico-chimiques dues à leur structure, leur masse moléculaire, leur ramification ou encore leur fonctionnalisation.<sup>[112]</sup>

Dans le but de développer un catalyseur bio-inspiré pouvant être considéré comme une enzyme artificielle, nous avons choisi de travailler avec un polymère de type polyéthylèneimine (PEI), qui est un polymère hyperbranché de masse moléculaire moyenne de 25 kDa, comportant des amines primaires, secondaires et tertiaires dans un rapport de 25/50/25 en pourcentage massique. Un des avantages de ce polymère est qu'il est très facile à fonctionnaliser, afin d'ajouter différents substituants pour générer un environnement localement hydrophobe ou apporter toute sorte de fonctionnalité désirée. Il a été démontré que ce polymère différemment substitué était capable d'agir comme une enzyme artificielle pour réaliser des réactions telles que l'hydrolyse d'esters,<sup>[113]</sup> la décarboxylation des acides oxalacétiques<sup>[114]</sup> et nitrobenzyloxazoliques,<sup>[115]</sup> l'élimination de Kemp,<sup>[116]</sup> la transamination <sup>[117,118]</sup> ainsi que l'hydrolyse de phosphates.<sup>[119–121]</sup>

La première étape consiste à fonctionnaliser le polymère commercial (**PEI<sub>com</sub>**) hyperbranché de 25 kDa avec différents substituants.

i) Des groupements octyle (ou benzyle), permettant de générer un environnement localement hydrophobe au sein du polymère.



h de réaction et une seconde substitution nucléophile a lieu entre le groupement pyrazole de la praxadine et les amines libres restantes du polymère. La réaction entre les groupements pyrazole et les amines étant plus longue, le milieu réactionnel est alors laissé sous agitation à température ambiante durant 4 jours afin d'avoir un taux de greffage maximal et de façon à ce que le temps ne soit pas un facteur limitant. Concernant les polymères trifonctionnalisés, leur synthèse, réalisée dans des conditions similaires, sera présentée ultérieurement dans le manuscrit.

Les polymères poly-fonctionnalisés ainsi obtenus sont par la suite purifiés par dialyse afin de les récupérer en solution aqueuse. Les concentrations en polymères et les proportions des groupements octyle et guanidinium greffés sont déterminées par spectroscopie RMN après lyophilisation du polymère et resolubilisation dans un solvant deutéré. Afin de pouvoir réaliser une bibliothèque de polymères avec des propriétés variées, différentes proportions de réactifs ont été utilisées.

## II. Quantification des polymères par RMN $^1\text{H}$ .

### 1. Polymères bifonctionnalisés guanidinium-octyle.

La synthèse des polymères bifonctionnalisés avec des groupements guanidinium et octyle a été effectuée avec différentes proportions de réactifs, afin de créer une bibliothèque de polymères variée possédant des propriétés physiques bien distinctes. Nous avons donc tout d'abord fait varier la quantité de guanidinium de 0,2 à 0,4 équivalent par rapport à la quantité de monomères et la quantité d'octyle de 0 à 2 équivalents. L'influence de l'ordre d'ajout des réactifs a également été étudiée. Ces polymères ont ensuite été caractérisés par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  (Figure 69) soit dans l'éthanol  $\text{d}_6$ , soit dans  $\text{D}_2\text{O}$  après lyophilisation.

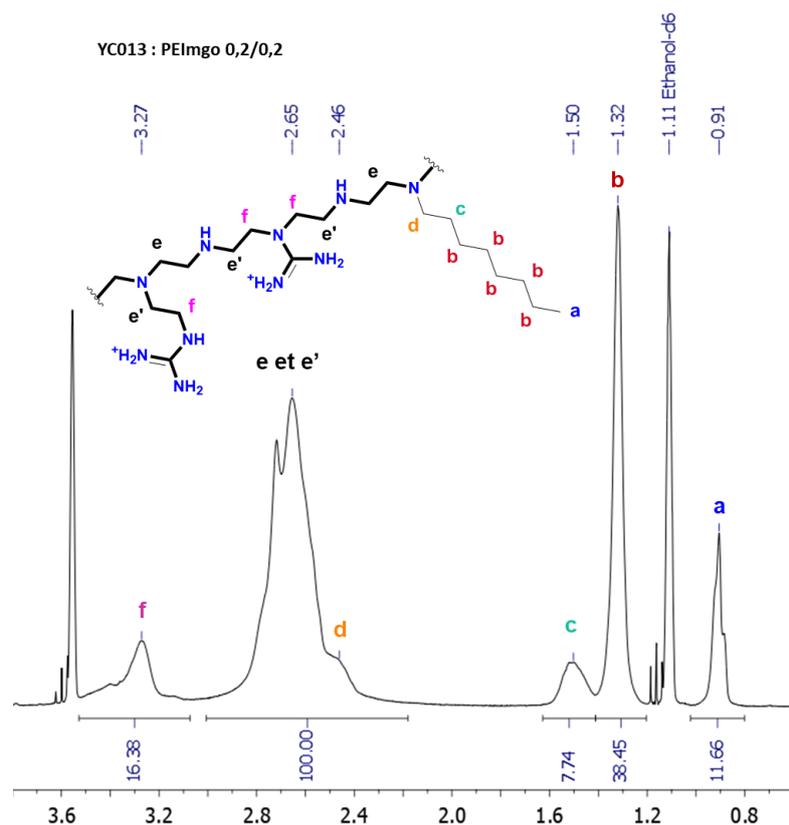


Figure 69 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 300 MHz dans l'éthanol  $\text{d}_6$  d'un polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium et octyle.

Afin de simplifier la compréhension des spectres RMN  $^1\text{H}$  des polymères bifonctionnalisés, des amines de faibles poids moléculaires ont d'abord été utilisées ((2,2-(diméthylamino)éthyl)amino)methaniminium **1**, amino((2-((amino(iminio)méthyl)(méthyl)amino)éthyl)amino)methaniminium **2**, et amino((2-(méthylamino)éthyl)amino)methaniminium **3** pour mimer le greffage des groupements guanidinium sur les amines du polymère. Ces molécules modèles nous ont ainsi permis d'identifier les déplacements chimiques des protons **e'** et **f** (Figure 69), à l'aide notamment du spectre RMN  $^1\text{H}$  de la molécule **1** (figure 68A), qui nous indique que le déplacement chimique des protons en  $\alpha$  (**c**) de la fonction guanidinium est fortement déblindé par rapport à ceux situés en position  $\beta$  (**b**). De plus, le spectre RMN  $^1\text{H}$  de la molécule **2** (Figure 70B), montre que les protons (**B/C**) localisés sur les méthylènes entre deux fonctions guanidinium ont un déplacement encore plus déblindés que ceux situés en  $\alpha$  d'une seule fonction guanidinium (**c**). Cela explique pourquoi le pic dû aux protons (**f**) du polymère n'est pas symétrique et s'étend un peu à plus bas champs. L'attribution des pics correspondant aux protons des groupements octyle, n'a quant à elle

posé aucun problème avec une discrimination claire entre les pics des méthyles (a) ainsi que ceux correspondant aux protons des méthylènes (b), (c) et (d).

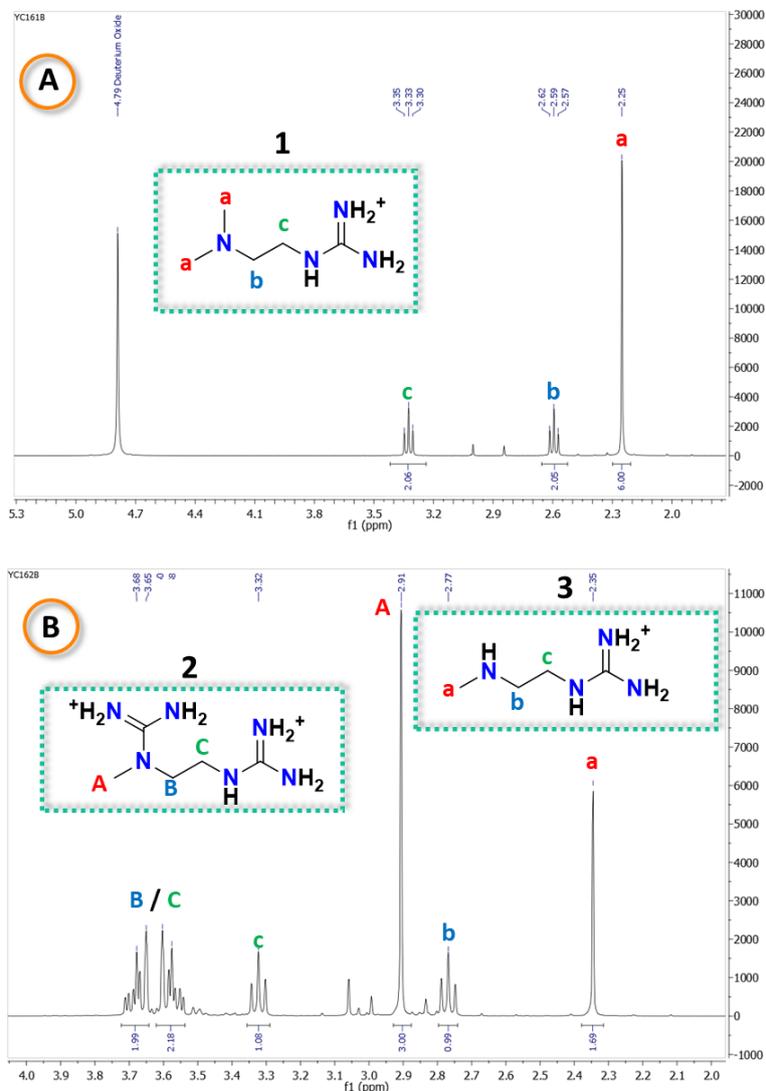


Figure 70: spectre RMN  $^1\text{H}$  de (A) l'amine((2-(diméthylamino)éthyl)amino)méthaniminium et (B) de l'amine((2-((amino(iminio)méthyl)(méthyl)amino)éthyl)amino)méthaniminium (à gauche) et de l'amine((2-(méthylamino)éthyl)amino)méthaniminium (à droite).

La concentration ainsi que les taux de greffages ont été calculés à l'aide des spectres RMN  $^1\text{H}$  obtenus pour les différents polymères. Le détail des calculs est décrit dans la partie expérimentale. Les résultats obtenus pour la caractérisation de ces polymères bifonctionnalisés ont été rassemblés dans le Tableau 12. Ils montrent que les taux de greffages expérimentaux sont nettement inférieurs

## Chapitre 2 : Fonctionnalisation et caractérisation des différents polymères

aux taux de greffages théoriques attendus. Ces résultats montrent aussi que l'ordre d'addition des réactifs est également un point important à prendre en compte.

Tableau 12 : Fonctionnalisation du polymère commercial théorique et expérimentale quantifiée par RMN  $^1\text{H}$  en fonction de l'ordre d'ajout des réactifs.

1-Iodooctane 2-Praxadine				1-Praxadine 2- Iodooctane			
Numéro polymère	Nombre d'équivalent théorique guani/octyle vs [mono]	Nombre d'équivalent mesuré par RMN guani/octyle vs [mono]	[PEI] <sub>f</sub> (mM)	Numéro polymère	Nombre d'équivalent théorique guani/octyle vs [mono]	Nombre d'équivalent mesuré par RMN guani/octyle vs [mono]	[PEI] <sub>f</sub> (mM)
1	0,2/0	0,12/0	101	17	0,2/1	0,2/0,18	68
2	0,2/0,2	0,17/0,17	95	18	0,2/1,2	0,2/0,19	54
3	0,2/0,4	0,17/0,24	66	19	0,2/1,4	0,2/0,24	70
4	0,2/0,6	0,17/0,37	112	20	0,2/1,6	0,2/0,23	62
5	0,2/0,8	0,17/0,41	89	21	0,2/1,8	0,2/0,23	64
6	0,2/1	Précipitation en fin de dialyse		22	0,2/2	0,2/0,24	48
7	0,2/1,2			23	0,4/0,2	0,18/0,01	73
8	0,2/1,4			24	0,4/0,4	0,25/0,02	80
9	0,2/1,6			25	0,4/0,6	0,24/0,04	85
10	0,2/1,8			26	0,4/0,8	0,24/0,05	69
11	0,2/2						
12	0,4/0	0,09/0	88				
13	0,4/0,2	0,26/0,19	90				
14	0,4/0,4	0,28/0,27	87				
15	0,4/0,6	0,29/0,34	35				
16	0,4/0,8	0,25/0,38	88				

Lorsque l'on étudie le taux de greffage de la série 1 (0,2 équivalent en praxadine), au cours de laquelle l'addition d'iodooctane se fait avant celle de la praxadine, on constate que l'on obtient un taux de greffage maximal en guanidinium à partir de 0,2 équivalent d'iodooctane ajouté. Cependant, lorsque le nombre d'équivalents d'iodooctane ajoutés est supérieur ou égal à 1 équivalent, le polymère précipite en cours de dialyse et ceci peut être expliqué par une trop grande hydrophobie des polymères, à cause de la forte concentration en groupements octyle. L'augmentation du nombre

d'équivalent de praxadine (série 2, 0,4 équivalent de praxadine) permet d'accroître le taux de greffage en guanidinium, mais laisse inchangé le taux de greffage pour les groupements octyle. Ensuite, pour les séries 3 et 4, l'ordre d'addition des composés est inversé et il est important de noter que le taux de greffage expérimental en octyle est nettement inférieur au taux de greffage théorique malgré des quantités d'iodooctane importantes. L'explication pour ces résultats provient certainement de la présence des groupements guanidinium qui sont greffés préférentiellement sur les amines primaires du polymère et, au vu de la taille ainsi que de la charge de ces groupements, l'espace restant n'est pas suffisant pour insérer des groupements octyle. Pour résumer : lorsque le taux de greffage en guanidinium est faible (série 1), le polymère peut être très hydrophobe en raison d'une forte proportion de groupements octyle greffés et peut ainsi précipiter en solution. Au fur et à mesure que le taux de guanidinium augmente (série 2), les groupements cationiques vont pouvoir atténuer l'effet hydrophobe des octyles et faciliter ainsi la solubilité du polymère. D'autre part, l'ajout des groupements guanidinium avant les octyles (série 3 et 4) semble bloquer l'insertion des chaînes alkyles probablement à cause de la taille des groupements qui ne laisse plus suffisamment d'espace aux groupements octyle. Il faut également prendre en compte que les amines primaires et la moitié des amines secondaires ont peut-être déjà réagi et donc, que la réaction n'est tout simplement plus possible, excepté peut-être en forçant les conditions opératoires (chauffage par exemple). C'est pour ces raisons que nous avons privilégiés la première méthode de synthèse qui permet d'insérer plus de groupements octyle avec une meilleure répétabilité.

## 2. Polymères bi et trifonctionnalisés guanidinium-octyle-acide carboxylique.

A la suite des travaux d'Imada sur la synthèse de flavines substituées en position N<sub>3</sub> par une chaîne peptidique (p 59 de l'introduction),<sup>[111]</sup> des polymères bi- et trifonctionnalisés avec des groupements acides carboxyliques ont été envisagés, afin de potentiellement stabiliser l'intermédiaire (hydro)peroxy qui pourrait se former lors des réactions d'oxydation en présence du polymère (Figure 71). Les deux acides carboxyliques choisis pour la synthèse de ces polymères sont l'acide 4-bromométhyl-benzoïque et l'acide 4-bromo-butanoïque, le dernier offrant une meilleure flexibilité pour le positionnement du groupement carboxylate en raison de sa chaîne alkyle.

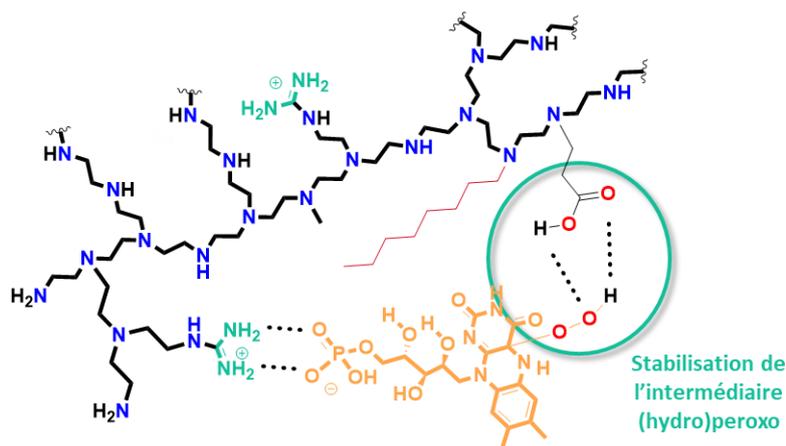


Figure 71 : Représentation schématique d'un polymère trifonctionnel octyle, guanidinium et acide carboxylique avec la potentielle stabilisation d'un intermédiaire peroxy sur la flavine incorporée au polymère.

Pour cela, nous avons tout d'abord synthétisé des polymères trifonctionnalisés avec des groupements 4-bromométhyl-benzoïque. Une quantité d'acide correspondant à 0,2 équivalent par rapport à la concentration en monomère du **PEI<sub>com</sub>**, est ajoutée, soit après les deux autres substituants (octyle et guanidinium), soit avant l'ajout de la praxadine. Or, lors de ces essais, une précipitation a été observée en fin de dialyse quel que soit l'ordre d'addition, ce qui peut être expliquée par la présence des chaînes octyle et des groupements aromatiques induisant une hydrophobicité trop importante du polymère. Malgré la suppression des groupements octyle, les polymères fonctionnalisés avec l'acide para toluïque et guanidinium, n'ont pas réussi à être caractérisés en fin de dialyse, en raison de problèmes de solubilité. Suite à ces résultats, nous avons décidé d'utiliser un autre acide, l'acide 4-bromobutanoïque qui pourrait apporter une certaine hydrophobicité comme pourrait le faire la chaîne octyle. Plusieurs polymères ont alors été synthétisés avec différentes proportions en substituants (Tableau 13).

## Chapitre 2 : Fonctionnalisation et caractérisation des différents polymères

Tableau 13 : Liste des polymères bifonctionnalisés par des groupements guanidinium-acide carboxylique (acide 4-bromobutanoïque) synthétisés au cours de cette étude.

Numéro polymère	Nombre d'équivalent théorique guani/acide vs [mono]	Nombre d'équivalent mesuré par RMN guani/acide vs [mono]	[PEI] <sub>f</sub> (mM)
27	0,1/0,1	0,11/0,04	46
28	0,1/0,2	0,1/0,05	55
29	0,1/0,3	0,1/0,04	57
30	0,2/0,1	0,1/0,02	61
31	0,2/0,2	0,1/0,02	62
32	0,2/0,3	0,11/0,03	54
33	0,3/0,1	0,11/0,02	63
34	0,3/0,2	0,11/0,02	78
35	0,3/0,3	0,14/0,04	65
36	0,3/0,6	0,12/0,05	78

Lorsqu'on étudie le taux de greffage effectif des groupements de type guanidinium et acide carboxylique, on observe qu'il est similaire, quelles que soient les proportions de substituants ajoutées lors de la réaction. Il est possible qu'une fois insérés dans le polymère, les premiers groupements acide induisent un repliement du polymère par interaction électrostatique avec les groupements guanidinium, limitant ainsi le greffage des groupements carboxylate. De la même façon, des polymères trifonctionnalisés ont également été synthétisés avec cet acide carboxylique.

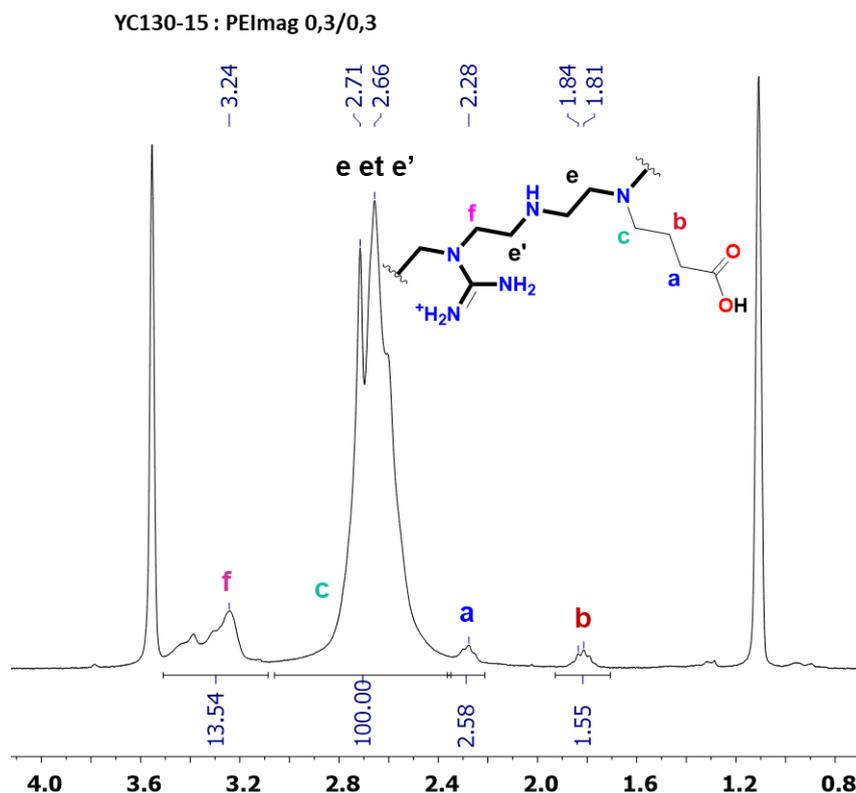


Figure 72 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 300 MHz dans l'éthanol  $\text{d}_6$  d'un polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium et acide carboxylique (acide 4-bromobutanoïque).

Tableau 14 : Liste des polymères trifonctionnalisés par des groupements guanidinium/ acide carboxylique/ octyle synthétisés au cours de cette étude.

Numéro polymère	Nombre d'équivalent théorique guani/octyle/acide vs [mono]	Nombre d'équivalent mesuré par RMN guani/octyle/acide vs [mono]	$[\text{PEI}]_f$ (mM)
37	0,2/0,2/0,2	0,18/0,14/0,05	89
38	0,4/0,4/0,4	0,29/0,33/0,06	55

L'ajout du groupement octyle ne permet pas un meilleur taux de greffage de la fonction acide (0,05 eq), en revanche, l'apport de charge négative permet une meilleure hydrophilie favorisant ainsi la solubilité du  $\text{PEI}_{\text{mago}}$  38, qui possède pourtant un taux de greffage important en groupements octyle.

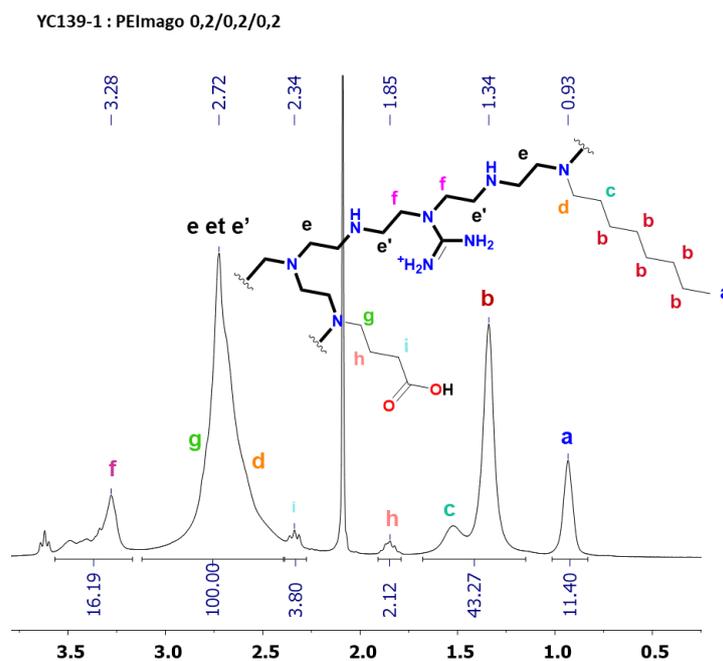


Figure 73 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 300 MHz dans l'eau deutéré d'un polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium, acide carboxylique (acide 4-bromobutanoïque) et octyle.

Malgré les efforts investis, les polymères synthétisés ne présentent pas une grande diversité. Cependant, quelques polymères se distinguent et seront principalement utilisés par la suite. C'est le cas de **PEIm<sub>g</sub> 12** qui ne présente pas de groupements octyle, de **PEIm<sub>go</sub> 5** qui possède un taux de greffage élevé en octyle, de **PEIm<sub>ago</sub> 38** en tant que polymère trifonctionnalisé, et enfin, le polymère de référence **PEIm<sub>go</sub> 2**.

### III. Polymère chiral.

#### 1. Synthèse d'un polymère chiral

Après avoir réussi à synthétiser des polymères comportant un microenvironnement potentiellement hydrophobe, il a été envisagé de générer un environnement chiral au sein du polymère, qui pourrait éventuellement permettre de réaliser des transformations stéréosélectives. Pour cela, une simple substitution nucléophile à l'aide de dérivés chiraux en remplacement des groupements octyle est envisagée. Toutefois, la présence des groupements guanidinium reste importante, afin de pouvoir interagir avec les groupements phosphate de la FMN. Pour ce faire, un dérivé de bi-naphtyle, composé chiral couramment utilisé en catalyse asymétrique, a été introduit sur le polymère (Figure 74). Le même protocole de synthèse que celui décrit précédemment a été

utilisé pour réaliser ce polymère, avec 0,2 équivalent de guanidinium et 0,2 équivalents de bi-naphtyle.

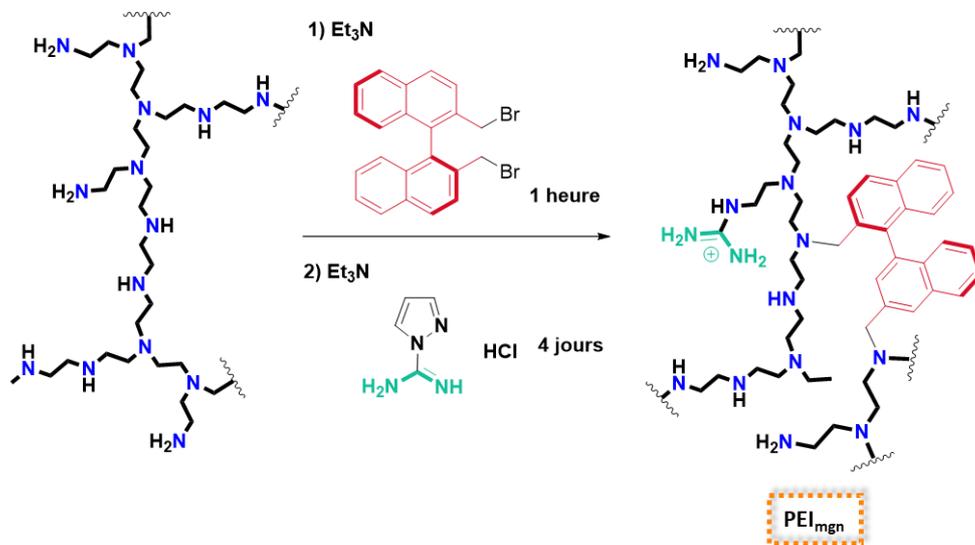


Figure 74 : Schéma de synthèse pour un polymère bifonctionnelisé par des groupes guanidinium-bi-naphtyle.

## 2. Caractérisation du polymère chiral.

Comme précédemment, le polymère est lyophilisé avant d'être analysé par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  (Figure 75) afin de déterminer les proportions des différents substituants. En revanche, pour la chiralité, une analyse par dichroïsme circulaire est nécessaire afin de déterminer si la chiralité du dérivé bi-naphtyle a été transférée au polymère lors du greffage (Figure 76).

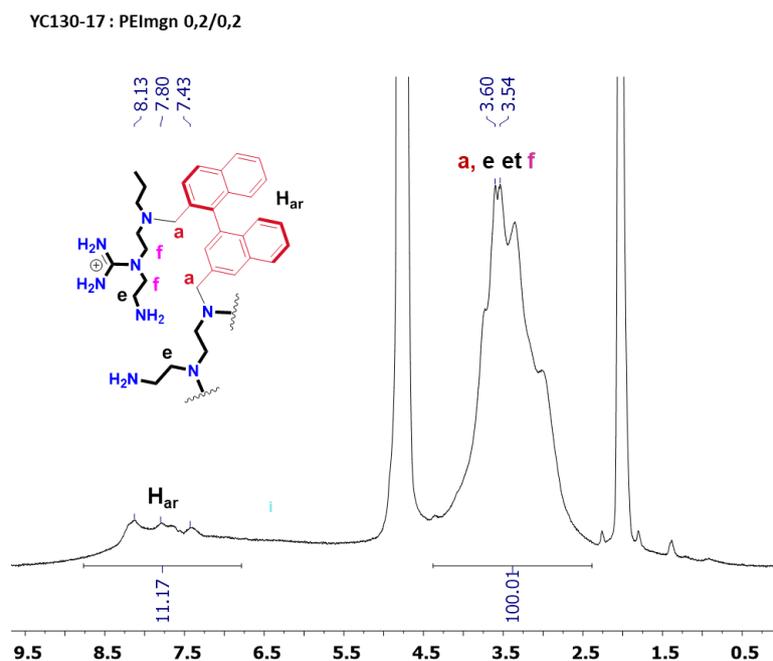


Figure 75 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 300 MHz dans l'eau deutérée d'un polymère fonctionné par des groupements guanidinium et bi-naphtyle.

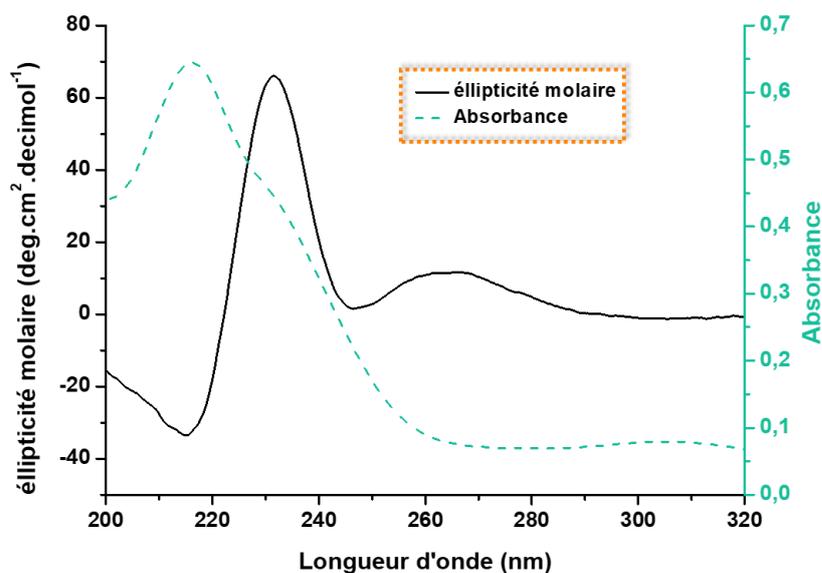


Figure 76 : Spectre UV-visible d'une solution aqueuse contenant le polymère chiral (0,1 mM) (- - -). Spectre de dichroïsme circulaire d'une solution aqueuse contenant le polymère chiral (0,5 mM) (—).

En comparant à la littérature, le signal obtenu en dichroïsme circulaire pour le polymère modifié sur la Figure 76, est similaire à celui du composé bi-naphtyle en solution.<sup>[123]</sup> On peut donc en déduire que la chiralité a été transférée avec succès au polymère lors du greffage.

Un tel polymère peut être d'un grand intérêt à la fois pour la chimie radicalaire et pour la chimie d'oxydation. En effet, une fois le radical généré à proximité de la FMN dans le polymère chiral, le microenvironnement pourrait ainsi forcer la réaction radicalaire à se dérouler de manière stéréosélective. De même, dans le cas de la formation de l'intermédiaire (hydro)peroxo, les réactions d'oxydation pourraient également se dérouler de manière sélective en raison de l'environnement chiral direct autour de la FMN.

#### **IV. Conclusion**

Pour conclure une bonne partie des polymères initialement envisagés a pu être synthétisée et caractérisée par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  (polymère bi et trifonctionnalisés, polymère chiral) . Malgré une faible diversité au niveau des taux de greffage des polymères synthétisés, quelques polymères se distinguent et seront principalement utilisés par la suite (**PEI<sub>mgo</sub> 2**, **PEI<sub>mgo</sub> 5**, **PEI<sub>mg</sub> 12**, **PEI<sub>mago</sub> 38** et le **PEI<sub>com</sub>**). Nous avons montré qu'il était probable que plusieurs de ces polymères soient chimiquement non synthétisables pour les raisons décrites précédemment (taux de greffage trop important, précipitation, etc...). Pour plus de clarté, la dénomination des polymères sera la suivante : par exemple le polymère modifié 3, dans le Tableau 12, sera dénommé **PEI<sub>mgo</sub> 3 (0,17/0,24)**, 0,17 correspondant au greffage des groupements guanidinium et 0,24 à celui des groupements octyle. Le polymère de référence utilisé pour toutes les expériences de caractérisation et de catalyse sera le **PEI<sub>mgo</sub> 2 (0,17/0,17)** et nous l'appellerons : **PEI<sub>ref</sub>**.

## **Chapitre 3 : Assemblage de l'enzyme artificielle et catalyse d'oxydation**

La synthèse et la caractérisation des polymères décrites dans le **Chapitre 2** ont permis d'obtenir une grande diversité de polymères. Il est maintenant primordial de bien comprendre comment ces polymères peuvent interagir en solution aqueuse avec le cofacteur FMN, avant de commencer les études catalytiques

### **I. Etude de l'enzyme artificielle.**

#### **1. Incorporation de la FMN dans le polymère modifié**

Comme vu précédemment, la FMN absorbe la lumière avec deux bandes caractéristiques à 370 et 450 nm en solution aqueuse. Par ailleurs, la bande à 370 nm est particulièrement sensible à son environnement et il est connu que cette bande subit un déplacement hypsochrome d'une dizaine de nanomètres lorsque la flavine se trouve en solution dans un solvant hydrophobe.<sup>[124]</sup> Cette caractéristique devrait donc nous permettre de savoir si la FMN est incorporée dans l'environnement hydrophobe localement généré au sein du polymère. La Figure 77 **A** montre le spectre d'absorbance de la FMN en présence et en absence du polymère modifié ( $PEI_{ref} : PEI_{mgo} 2 (0,17/0,17)$ ). On remarque un déplacement d'environ 12 nm de la bande à 374 nm lors de l'ajout du polymère modifié à une solution de FMN. Ce résultat démontre l'insertion de la FMN dans un environnement hydrophobe, celui du polymère. Autre point intéressant, lorsque l'expérience est effectuée avec le polymère commercial (Figure 77 **B**), un décalage plus faible est observé. Cette incorporation est sans doute rendue possible par la protonation des amines du polymère qui génère des groupements ammonium et facilite l'insertion de la FMN dans le polymère commercial. L'absence des groupements octyle diminue cependant le caractère hydrophobe du polymère.

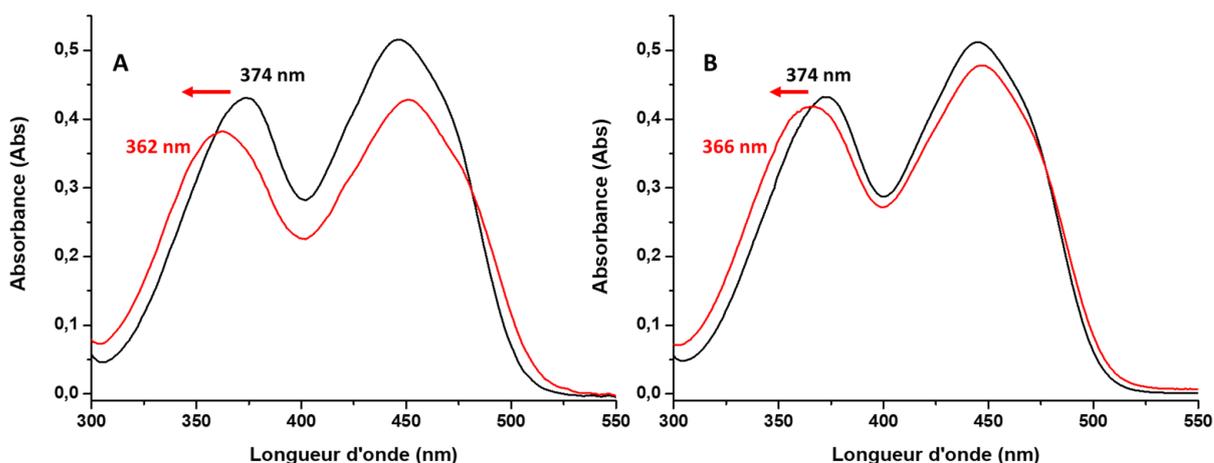


Figure 77 : (A) Spectre UV-Visible d'une solution de FMN dans l'eau à 50  $\mu$ M (—) et en présence de  $PEI_{ref}$  50 mM (—). (B) Spectre UV-Visible d'une solution de FMN dans l'eau à 50  $\mu$ M (—) et en présence du Polymère commercial 50 mM (—).

Le système devant être utilisé en catalyse, il est important de savoir si l'ajout d'un substrat gêne l'insertion de la FMN au sein du polymère. Pour cela, nous avons réalisé le spectre d'absorption de la FMN en présence de  $PEI_{ref}$  avec des concentrations croissantes de bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (substrat potentiel pour de futures réactions catalysées par l'enzyme artificielle  $PEIm$ -FMN). Comme on peut le constater sur la Figure 78, l'ajout d'un large excès de substrat (2000 équivalents par rapport à la FMN), ne modifie pas le spectre et le même décalage d'une dizaine de nanomètres est observé. Ceci indique que l'excès de substrat n'exclut pas la FMN de l'environnement localement hydrophobe du polymère modifié.

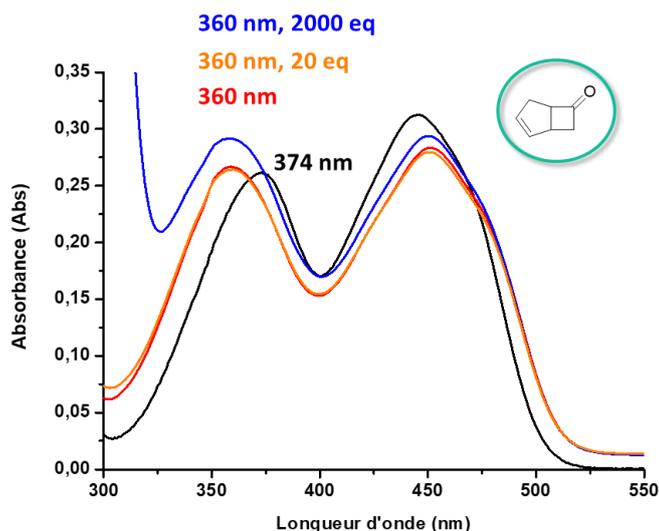


Figure 78 : Spectre UV-visible de la FMN dans l'eau à 25  $\mu\text{M}$  (—) en présence de polymère 25 mM (—) avec différentes proportions de substrat, 0,5 mM (20 équivalents (—)) et 50 mM (2000 équivalents (—)).

## 2. Etude de la réduction de la FMN par NADH dans l'eau

### a) Utilisation du polymère modifié PEI<sub>mgo</sub> 2 (0,17/0,17)

Après avoir démontré l'insertion de la flavine dans l'environnement hydrophobe du polymère, la réactivité de NADH avec le système **PEIm-FMN** a été étudiée. Un excès de NADH a été ajouté au système **PEIm-FMN** et la Figure 79 montre la variation d'absorbance à 340 nm caractéristique du NADH, en fonction du temps. En absence de **PEIm**, on remarque que cette absorbance reste relativement constante au cours du temps, ce qui signifie que le NADH n'est pas consommé et n'est donc pas en mesure de réduire efficacement la FMN en solution à ces faibles concentrations. En revanche, lorsque **PEI<sub>ref</sub>** est ajouté au milieu réactionnel, la cinétique de disparition de la bande à 340 nm est fortement améliorée (30 fois plus rapide avec le polymère). Dans ces conditions, la totalité des 20 équivalents de NADH est consommée en deux heures. Ceci indique que la FMN incorporée dans le polymère est capable d'oxyder un excès de NADH, démontrant également son comportement catalytique. Ce résultat nous incite à penser que la FMN est réduite en FMNH<sub>2</sub> puis réoxydée grâce à l'oxygène moléculaire. L'oxydation de FMNH<sub>2</sub> en FMN au cours du processus suggère la formation d'une espèce intermédiaire de type (hydro)peroxo comme cela est le cas au cours du cycle catalytique des BVMOs.

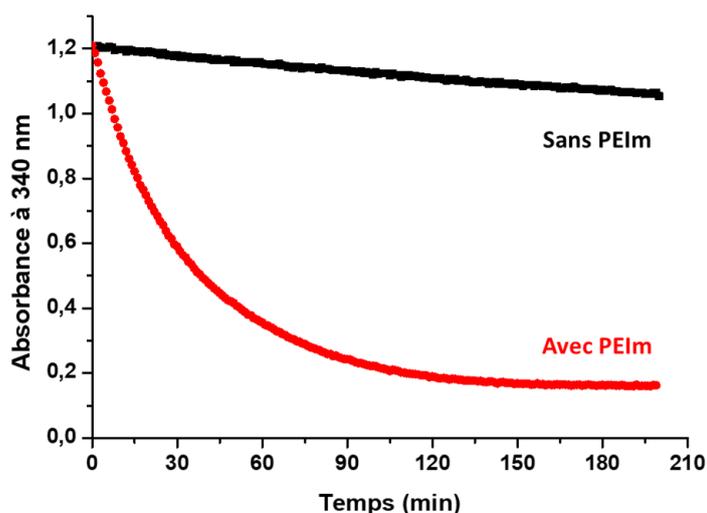


Figure 79 : Suivi de l'oxydation du NADH (400  $\mu$ M) en fonction du temps à 340 nm, dans une solution aqueuse de FMN (20  $\mu$ M) et de polymère (4 mM) (■) et sans polymère (■).

Afin de trouver les limites d'efficacité du système, la charge catalytique en FMN a été diminuée. Ainsi, la Figure 80 montre qu'en présence de 200 équivalents de NADH par rapport à la FMN, le système **PEIm**-FMN est toujours capable d'oxyder la totalité du NADH avec un temps de réaction relativement court (10 h). L'insertion de la FMN dans le polymère induit une accélération d'un facteur 100 de l'oxydation du NADH par la FMN. La réaction a également été effectuée avec 2000 équivalents de NADH par rapport à la FMN, mais dans ces conditions le système a besoin d'environ 4 à 5 jours pour consommer l'intégralité du NADH. De plus, sur des temps de réactions aussi longs, la dégradation du NADH devient également un problème. Pour la suite, ce sont donc 200 équivalents de NADH qui seront utilisés pour l'optimisation du système (pH, concentration du polymère...).

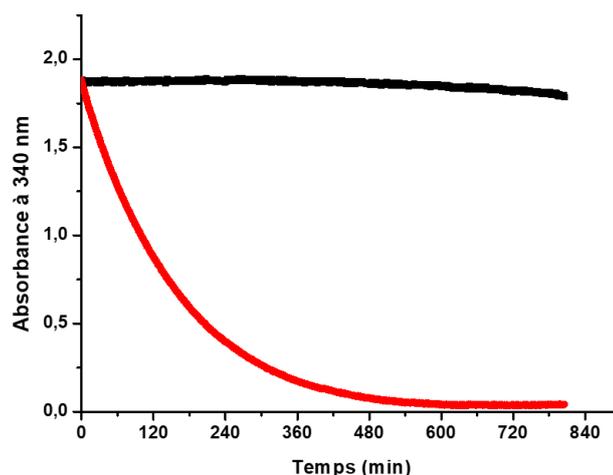


Figure 80 : Suivi de l'oxydation du NADH (400  $\mu$ M) en fonction du temps à 340 nm, dans une solution aqueuse de FMN (2  $\mu$ M) et de PE<sub>ref</sub> (4 mM) (■) et sans polymère (■).

Dans le but d'optimiser le système, une étude en fonction de la concentration du polymère a été réalisée, toujours en travaillant avec 200 équivalents de NADH par rapport à la flavine. On remarque sur la Figure 81 que la vitesse initiale d'oxydation du NADH est très faible pour des concentrations en polymère inférieures à 0,5 mM. Elle augmente ensuite rapidement pour atteindre un maximum pour des concentrations en polymère de 3 à 4 mM. Et enfin, elle décroît lorsque la concentration en polymère dépasse 4 mM (10 équivalents par rapport à NADH). Le positionnement du NADH par rapport à la FMN étant primordial pour un transfert d'hydrure optimal, la réactivité n'apparaît qu'au moment où le polymère commence à être saturé en NADH et donc le NADH idéalement placé à proximité de la FMN. Ainsi, à de faibles concentrations en polymère, le nombre restreint de « sites actifs » ne favorise pas la proximité des deux molécules et donc le transfert d'hydrure. En revanche, à forte concentration en polymère, la FMN et le NADH seront dans l'incapacité de saturer la totalité des sites actifs, diminuant également l'efficacité du système.

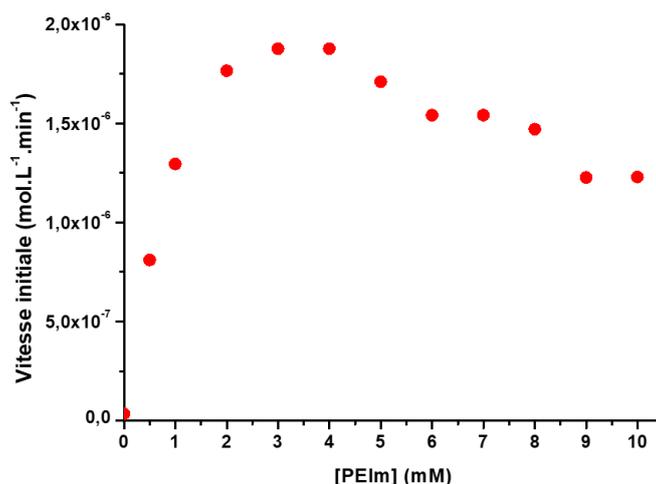


Figure 81 : Vitesse initiale de l'oxydation du NADH mesurée à 340 nm en fonction de la concentration en PEI<sub>ref</sub> d'une solution aqueuse de FMN (20 μM) PEI<sub>ref</sub> (x nm) et NADH (400 μM).

**b) Etude de l'influence du pH sur l'oxydation de NADH**

Ayant travaillé jusqu'à présent uniquement dans l'eau distillée pour l'étude de la consommation du NADH, il nous a semblé essentiel d'étudier l'influence du pH sur cette réaction et l'utilisation des tampons MES (pH 5 à 6,5), HEPES (pH 7 à 8) et CHES (pH 8,5-9) nous a permis de travailler à différentes valeurs de pH (Figure 82).

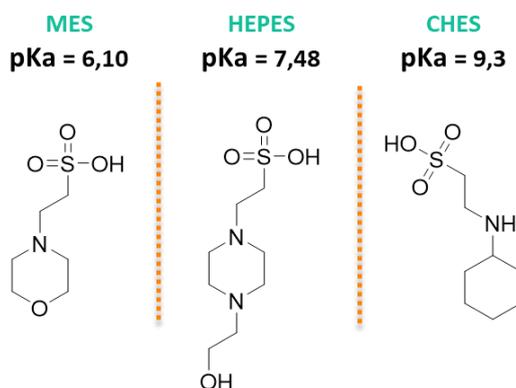


Figure 82 : Structure des tampons utilisés pour la catalyse.

La Figure 83 montre les vitesses initiales d'oxydation de NADH en présence ou en absence de polymère pour des pH compris entre 5,5 et 9. Les résultats nous indiquent que l'oxydation est d'autant plus efficace que le pH est acide, que ce soit avec ou sans le polymère. Le pH influence peu l'oxydation du NADH (un facteur 2 en présence de polymère), mais l'efficacité de l'enzyme artificielle

est tout de même légèrement améliorée pour des pH inférieurs à 7,5. Il semblerait donc que travailler à pH acide soit un choix judicieux, car dans ces conditions, les amines du polymère ainsi que les fonctions guanidinium sont protonées, ce qui favorise l'insertion de la FMN et du NADH au sein du polymère.

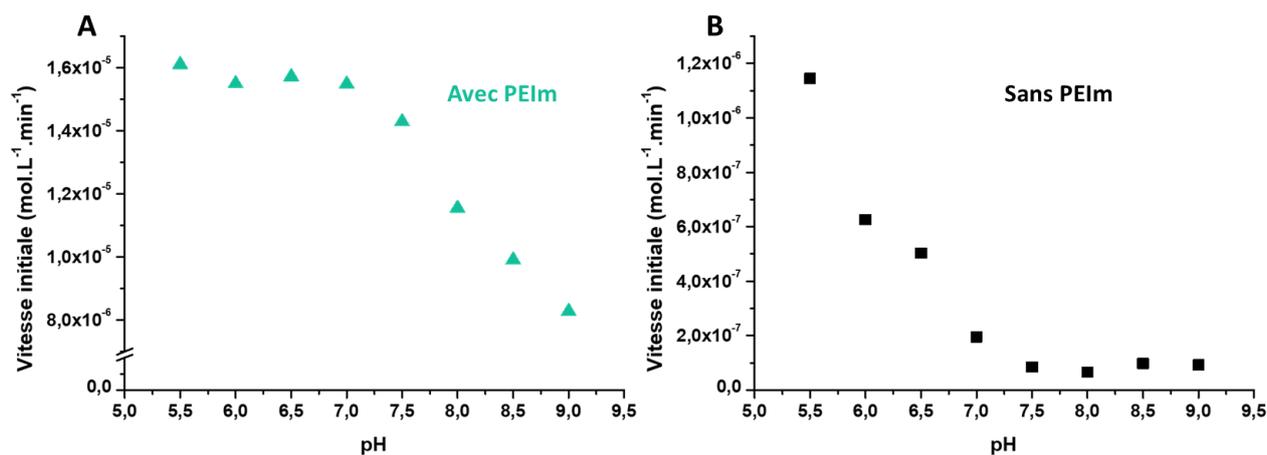


Figure 83 : Vitesse initiale de l'oxydation du NADH (400 µM) mesurée à 340 nm en fonction du pH, dans une solution aqueuse de FMN (2 µM) et de PEI<sub>ref</sub> (4 mM) (▲) et sans polymère (■), en solution tamponnée à pH 5,5 – 6,5 (MES 20 mM), à pH = 7 - 8 (HEPES 20 mM) ou à pH = 8,5 - 10 (CHES ou 20 mM).

### c) Influence de la nature des polymères sur l'oxydation de NADH

Un certain nombre de polymères ont été synthétisés avec des proportions en octyle et guanidinium différentes. Nous avons décidé d'étudier l'influence de la nature de ces substituants sur les cinétiques d'oxydation du NADH à différents pH. Cinq polymères ont ainsi été choisis pour leurs fonctionnalisations relativement différentes (les deux polymères mono-fonctionnalisés avec des groupements octyle PEI<sub>mo</sub> ou guanidinium PEI<sub>mg</sub>, le polymère de référence PEI<sub>ref</sub>, un polymère PEI<sub>mgo</sub> avec un fort taux de greffage en octyle et enfin le PEI<sub>com</sub>). D'une façon générale, pour les cinq polymères, l'effet du pH est similaire. La Figure 84 nous permet de voir qu'à pH acide (inférieur à 7,0), les vitesses initiales d'oxydation sont légèrement meilleures qu'à pH basique (par un facteur 5), comme déjà décrit précédemment. Cependant, il est difficile de ressortir une tendance en fonction des groupements greffés. En effet, que ce soit en présence de polymères mono-, bi- ou non-fonctionnalisés, la vitesse d'oxydation du NADH est relativement similaire, sauf pour le polymère fortement hydrophobes, où la vitesse est légèrement meilleure. Il apparaît au vu de ces résultats,

qu'avec une concentration en polymère adéquate, permettant l'insertion du NADH et de la FMN, l'oxydation du NADH est réalisable quelle que soit la nature du polymère utilisé (commercial, mono ou bifonctionnalisé).

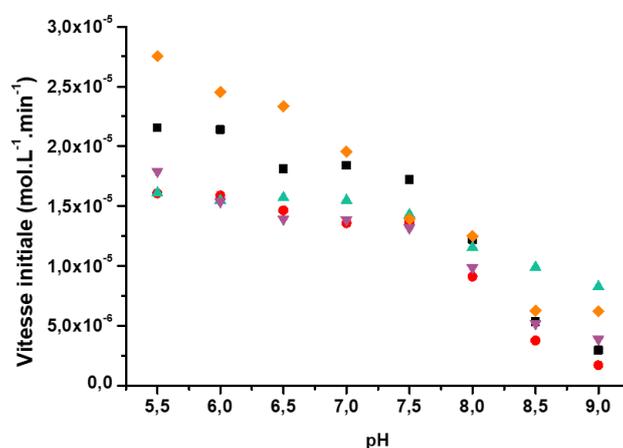


Figure 84 : Vitesse initiale de l'oxydation de NADH (400 µM) mesurée à 340 nm en fonction du pH pour des solutions contenant de la FMN (2 µM) et différents polymères (4mM) : (■) Polymère commercial, (●) polymère monofonctionnalisé en octyle (0,2 eq), (▼) polymère monofonctionnalisé en guanidinium PEI<sub>mg</sub> 12 (0,09 eq), (▲) PEI<sub>ref</sub> (0,17 eq en guanidinium et 0,17 eq en octyle) et (◆) polymère bifonctionnalisé PEI<sub>mgo</sub> 5 (0,17 eq en guanidinium et 0,41 eq en octyle).

#### d) Influence du substrat sur l'oxydation de NADH

Après avoir démontré l'oxydation du NADH par une quantité catalytique de FMN incorporée dans l'environnement hydrophobe du polymère, nous nous proposons d'examiner l'influence d'un potentiel substrat (la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one) sur cette oxydation. Sur la Figure 85, l'ajout de 2000 équivalents de substrat par rapport à la FMN n'accélère que très légèrement l'oxydation du NADH et cette modification n'est pas assez significative pour conclure sur l'influence du substrat à accélérer l'oxydation du NADH. Néanmoins, ces résultats confirment que le substrat n'interfère ni avec l'incorporation de la FMN (Figure 78) ni avec la réactivité entre la FMN et le NADH.

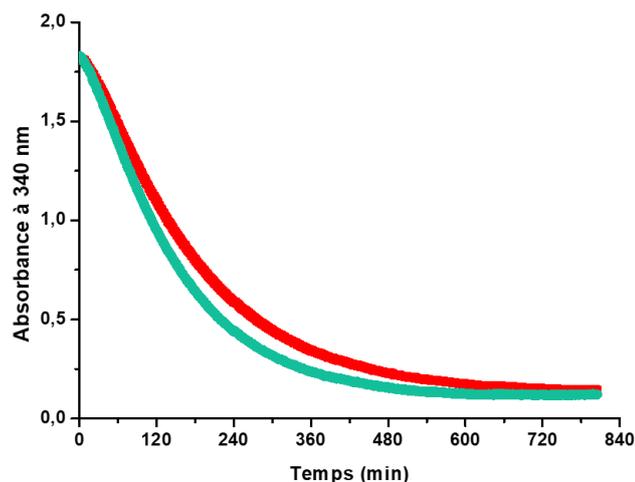


Figure 85 : Suivi de l'oxydation du NADH (400  $\mu$ M) en fonction du temps à 340 nm, dans une solution aqueuse de FMN (2  $\mu$ M), de PEI<sub>ref</sub> (4 mM) (■) et en présence de bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (4mM) (●).

Pour résumer cette étude spectroscopique, les résultats montrent que l'environnement hydrophobe du polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium et octyle est favorable à l'accueil de la FMN, permettant d'oxyder le NADH avec une quantité catalytique de FMN. De plus, l'ajout d'un substrat ne perturbe ni l'insertion de la FMN, ni l'oxydation du NADH mais n'engendre pas une accélération de l'oxydation de NADH. Pour finir, il semblerait que des conditions légèrement acides favorisent la réaction entre le NADH et la FMN.

## II. Catalyse d'oxydation de Baeyer-Villiger utilisant O<sub>2</sub> dans l'eau.

### 1. Première approche pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one

Les résultats précédemment obtenus ont permis de mettre en évidence l'incorporation de la FMN ainsi que sa réactivité avec le NADH en présence de polymère. Il est donc intéressant d'étudier le système PEIm-FMN-NADH en catalyse d'oxydation. La bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one semble être un substrat de choix. En effet, la présence d'une fonction cétone ainsi qu'une fonction alcène permet d'étudier également la sélectivité du catalyseur (Figure 86).

Comme décrit dans le Chapitre 1, la FMN est sensible à la lumière. Ainsi, l'intégralité des réactions seront réalisées en verrerie opaque (flacons ambrés) afin d'éviter des réactions parasites dues à la photo-activation de la FMN.

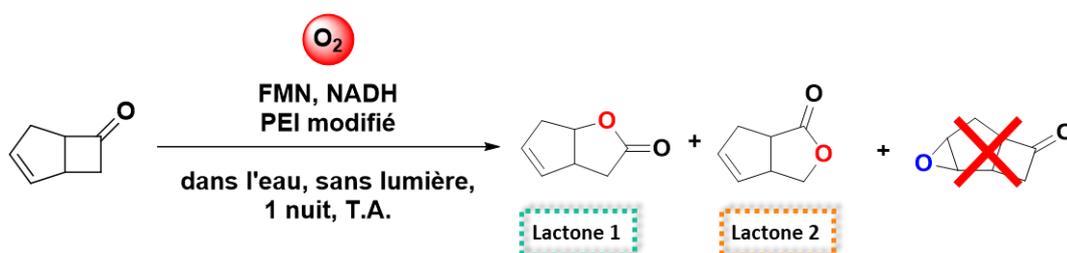


Figure 86 : Premier essai d'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) avec l'enzyme artificielle (FMN (5  $\mu\text{M}$ ), PEI<sub>ref</sub> (10 mM)) en présence de NADH (1 mM), dans l'eau à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Après une nuit à température ambiante dans l'eau, le mélange réactionnel contenant le système bio-inspiré, le substrat et le réducteur est analysé par spectrométrie de masse et spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  après traitement. L'analyse GC-MS (Figure 88) permet de mettre en évidence la formation de deux produits, dont un produit majoritaire avec un temps de rétention correspondant à la **lactone 1** (3,3a,6,6a-tetrahydro-2H-cyclopenta[b]furan-2-one), ainsi qu'un produit secondaire, la **lactone 2** (3,3a,6,6a-tetrahydro-1H-cyclopenta[c]furan-1-one) pour un rendement global de 50%. Les deux lactones ont été identifiées grâce à l'analyse GC-MS, puis leur structure a été confirmée par RMN  $^1\text{H}$ .

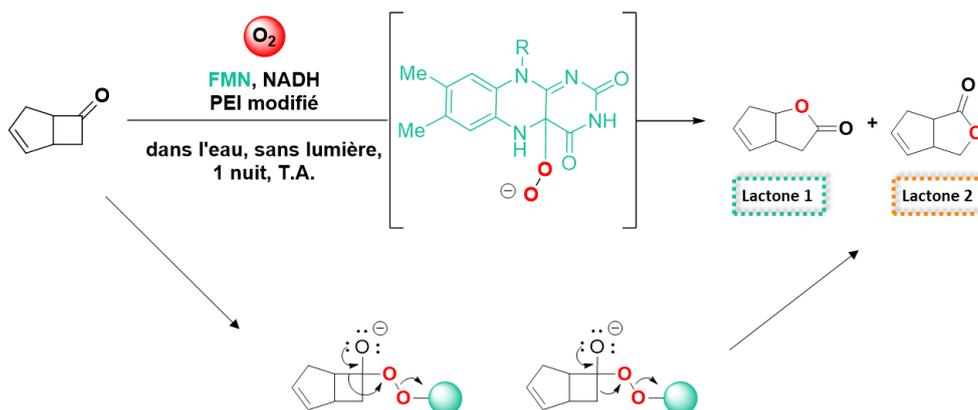


Figure 87 : Mécanisme d'oxydation de de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) avec l'enzyme artificielle (FMN (5  $\mu\text{M}$ ), PEI<sub>ref</sub> (10 mM)) en présence de NADH (1 mM), dans l'eau à température ambiante et sous pression atmosphérique.

La régiosélectivité de la réaction peut être expliquée par la vitesse de migration des groupements alkyle. En effet un carbone secondaire migre plus aisément qu'un carbone primaire lors

de l'étape de formation de la lactone (Figure 87). De plus, que ce soit en RMN ou lors de l'analyse GC-MS, aucune présence du produit d'époxydation n'a été observée, ce qui indique la formation exclusive des produits de la réaction de Baeyer-Villiger. Ce résultat très encourageant est le premier exemple d'une d'enzyme artificielle capable de catalyser une oxydation de type Baeyer-Villiger avec une flavine non modifiée, en solution aqueuse et en utilisant l'oxygène moléculaire comme oxydant.

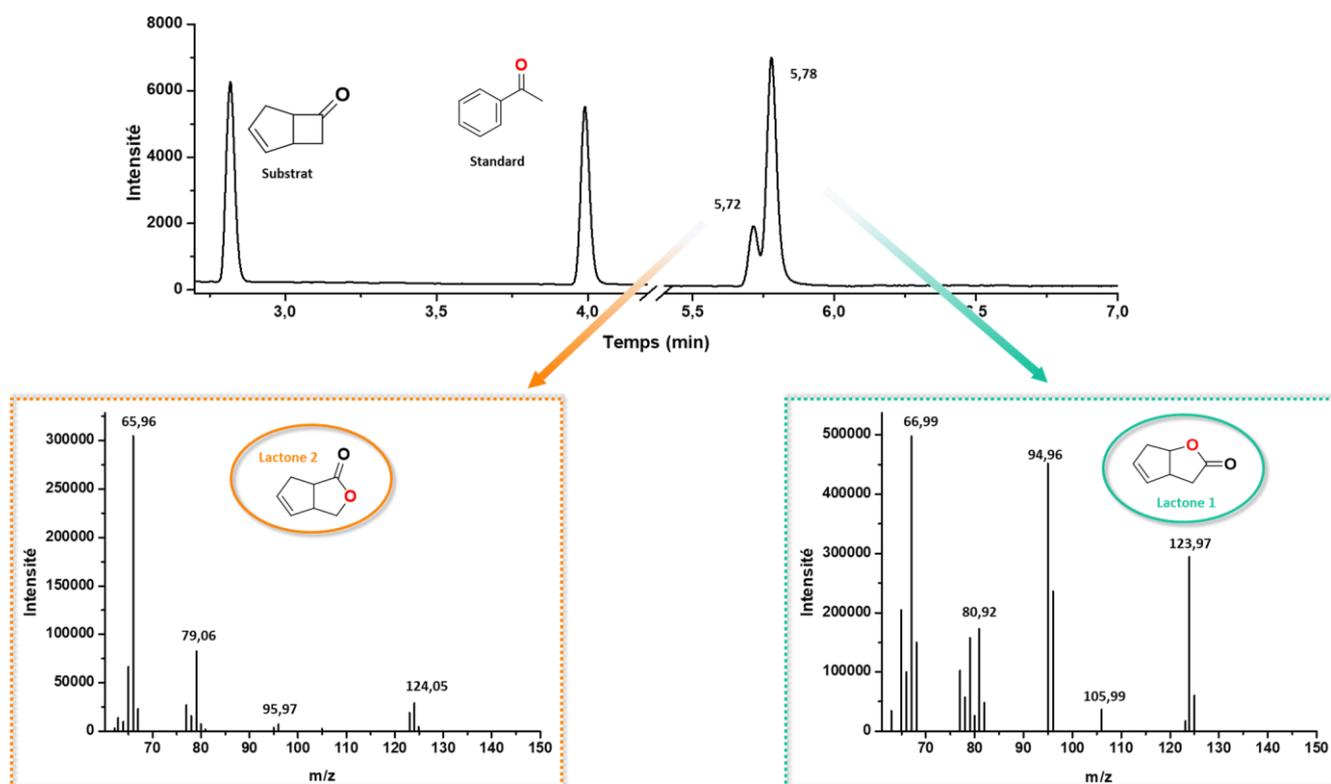


Figure 88 : Analyse GC-MS du brut réactionnel après oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one en présence de l'enzyme artificielle

Suite à ce résultat préliminaire prometteur, une phase d'optimisation a donc été mise en place en faisant varier différents paramètres tels que la nature et la concentration du polymère, le pH et la concentration du réducteur.

## 2. Optimisation des conditions pour la catalyse d'oxydation

### a) Influence des proportions polymère/catalyseur sur l'activité catalytique.

Les conditions réactionnelles choisies pour cette étude sont les mêmes que celles utilisées précédemment lors des études en spectroscopie UV-visible. Avant de commencer l'étude concernant l'influence de la nature des différents polymères utilisés, nous avons préalablement évalué l'influence des proportions du polymère **PEI<sub>ref</sub>** par rapport au catalyseur sur l'activité catalytique de l'enzyme artificielle, ainsi que l'influence du pH. Pour mémoire, la meilleure vitesse initiale d'oxydation du NADH a été obtenue en présence de 2000 équivalents en monomère de **PEI<sub>ref</sub>** par rapport à la FMN à pH acide.

Comme précédemment pour l'oxydation du NADH, une étude en fonction de la concentration du polymère est effectuée. Ainsi, la Figure 89 montre que la réaction effectuée en absence de polymère ne produit que 3% de lactones, ce qui est en accord avec la très faible consommation de NADH observée. Effectivement, en absence de polymère, le NADH n'est pas en mesure de réduire la FMN ce qui ne permet pas de former l'intermédiaire (hydro)peroxoflavine capable de réaliser l'oxydation de substrats organiques. D'autres contrôles ont également été réalisés, en absence d'oxygène, de NADH, ou du système **PEIm-FMN** et aucun produit d'oxydation n'a été observé après réaction. La réaction est donc possible seulement si les quatre composants FMN, polymère, NADH et oxygène sont réunis en solution. (Tableau 15).

Tableau 15 : Réactions contrôles

Conditions	Rendement (%)
Système complet <sup>a</sup>	70
Sans PEI	3
Sans NADH	0
Sans FMN	0
Sans O <sub>2</sub>	0

<sup>a</sup> à Condition : Substrat (10 mM), FMN (5 μM), NADH (1mM), substrat (10 mM)

Sur la Figure 89 sont présentés les rendements de l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one, ainsi que la vitesse initiale d'oxydation du NADH en fonction des différentes concentrations de polymère fonctionnalisé.

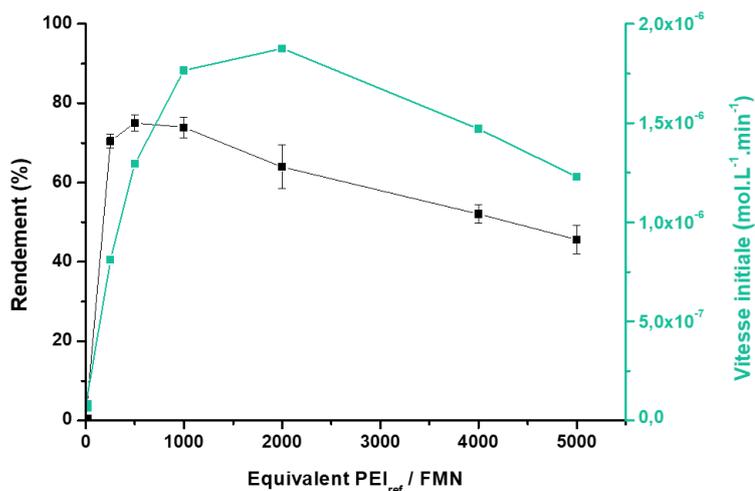


Figure 89 : Rendement global de l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en présence de de FMN (5  $\mu$ M), NADH (1mM) et PEI<sub>ref</sub> (x mM) (■). Vitesse initiale de l'oxydation du NADH mesurée à 340 nm en fonction du nombre d'équivalents en monomère du polymère d'une solution aqueuse de FMN (2  $\mu$ M), PEI<sub>ref</sub> (x nm) et NADH (400  $\mu$ M) (■).

Une différence notable de rendement est observée lors de la réaction. En absence de polymère, la vitesse initiale d'oxydation de NADH et le rendement de la réaction de BV sont quasiment nuls. En présence de faibles proportions en polymère, l'oxydation du NADH reste lente, alors que le rendement de la réaction de Baeyer-Villiger atteint rapidement 70%. Pour de plus fortes concentrations en polymère (supérieures à 1000 équivalents de monomère par rapport à la FMN), les rendements diminuent (rendement de 50% pour 5000 équivalents de monomère) de la même façon que la vitesse d'oxydation du NADH. Le rendement maximal est atteint pour environ 250 équivalents de PEIm (en monomère) par rapport à la concentration en flavine, malgré de faibles vitesses d'oxydations du NADH. Ce rendement reste ensuite stable jusqu'à 1000 équivalents de monomère alors que la vitesse initiale d'oxydation de NADH continue d'augmenter jusqu'à 2000 équivalents. Pour la suite, nous utiliserons donc une concentration en monomère de PEI<sub>ref</sub> de 1000 équivalents par rapport à la concentration de FMN afin de combiner une vitesse d'oxydation du NADH optimale ainsi qu'un bon rendement.

**b) Influence du pH sur la catalyse d'oxydation en milieu tamponné.**

Afin d'approfondir la compréhension de ce système catalytique, le pH est un paramètre important à prendre en compte. La réaction a ainsi été effectuée sur une gamme de pH allant de 5,5

à 9,5 (Figure 90). Pour des pH inférieurs à 7,0, seule la **lactone 1** est obtenue avec un rendement maximal de 47% à pH = 6,7. A pH plus basique, les deux lactones sont obtenues (90% de sélectivité pour la **lactone 1**) avec un rendement global maximal de 72% à pH = 9,0. Ces résultats peuvent être rationalisés. En effet, à pH basique, l'intermédiaire peroxyflavine formé est un meilleur nucléophile que la forme protonée (hydroperoxyflavine), expliquant les meilleurs rendements obtenus. En revanche, la sélectivité pour la **lactone 1** à pH acide est difficilement explicable. On peut supposer que la forme hydroperoxyflavine étant moins réactive que son homologue peroxy, la formation de la **lactone 2** n'est pas favorisée. Il est également possible que les faibles quantités de produits formés ne soient pas détectables lors de l'analyse.

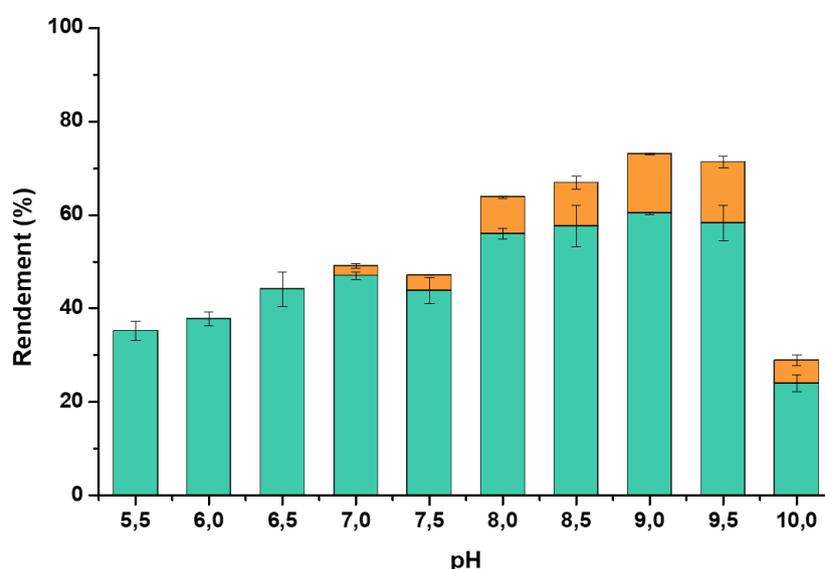


Figure 90 : Formation des lactones 1 et 2 en fonction du pH : réaction de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en présence de FMN (5  $\mu$ M) PEI<sub>ref</sub> (5 mM) NADH (1mM), durant 10 h, en solution tamponnée à pH 5,5 – 6,5 (MES 20 mM), à pH = 7 - 8 (HEPES 20 mM) ou à pH = 8,5 - 10 (CHES ou 20 mM), à température ambiante et sous pression atmosphérique.

### c) Cinétique d'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one

L'étude cinétique du système a permis de déterminer le temps optimal pour réaliser la réaction. La concentration en lactone atteint un plateau après 10 h de réaction avec un rendement de 70%, une excellente sélectivité pour la **lactone 1** (87%) et un TON d'environ 140. La réaction en absence de polymère durant un temps de réaction similaire, ne produit que 5% de lactone. De plus, la formation des lactones est en parfaite corrélation avec la consommation en NADH observée en

spectroscopie UV-visible. En effet, lorsque la totalité du NADH est oxydée en NAD<sup>+</sup> (après 10 h de réaction), on observe l'arrêt de la réaction (Figure 91).

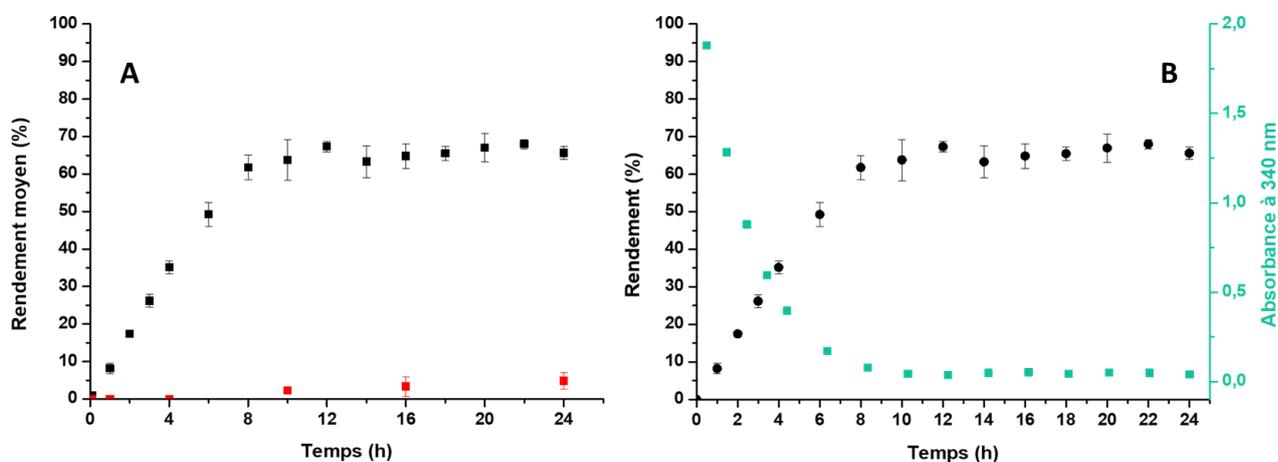


Figure 91 : A) Cinétique de formation des lactones 1 et 2 catalysée par l'enzyme artificielle FMN (5 µM), PEI<sub>ref</sub> (5 mM) (■) ou FMN (5 µM) (■) en présence de NADH (1 mM), en solution tamponnée à pH = 8,5 (20 mM CHES), à température ambiante et sous pression atmosphérique. B) Cinétique de formation des lactones 1 et 2 catalysée par l'enzyme artificielle FMN (5 µM), PEI<sub>ref</sub> (5 mM) en présence de NADH (1 mM) et bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM), en solution tamponnée à pH = 8,5 (20 mM CHES) (●), et suivi de l'oxydation du NADH (400 µM) en fonction du temps à 340 nm, dans une solution aqueuse de FMN (2 µM) et de PEI<sub>ref</sub> (4 mM) (■) à température ambiante et sous pression atmosphérique.

#### d) Influence de la concentration en réducteur sur l'activité catalytique.

Pour continuer l'optimisation et améliorer la compréhension du système, il était crucial d'étudier la concentration en réducteur. Des tests faisant varier la concentration en NADH de 200 équivalents à 6000 équivalents par rapport au cofacteur flavinique ont donc été effectués. Les temps réactionnels ont été allongés jusqu'à 66 h afin de permettre à l'enzyme artificielle de consommer la totalité du NADH. L'augmentation du NADH à des concentrations sur-stœchiométrique par rapport au substrat (supérieur à 10 mM) permet d'améliorer la conversion jusqu'à 58% avec un excellent TON de 1160. Cependant, les rendements en sont impactés, puisque le rendement maximal de 81% est obtenu pour une concentration en NADH de 2 mM (tableau 16). Dans des conditions stœchiométriques, une conversion de 42% est obtenue. La diminution des rendements observée pour de fortes concentrations en NADH, peut être due à des temps réactionnels trop courts pour consommer la totalité du réducteur, à un environnement qui devient trop réducteur pour permettre la stabilisation d'un intermédiaire peroxyflavine et/ou à un phénomène de dégradation du NADH qui commence à rentrer en jeu pour ces temps de réaction. Par ailleurs, le coût élevé du NADH (165 000

€ / Kg) n'est pas une option judicieuse pour réaliser des réactions avec des quantités sur-stœchiométriques de réducteur.

Tableau 16 : Rendement, conversion et TON mesurés pour la réaction de Baeyer-Villiger utilisant la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) comme substrat en présence de FMN (5  $\mu$ M) PEI<sub>ref</sub> (5mM) en fonction de la concentration de NADH, en solution tamponnée à pH = 8,5, (CHES 20 mM), à température ambiante et sous pression atmosphérique durant 66h.

NADH (mM)	Rendement vs NADH(%)	Conversion (%)	TON
1	67	7	135
2	<b>81</b>	16	325
4	62	25	500
6	53	31	640
8	48	40	770
10	42	42	840
15	56	56	1100
20	58	<b>58</b>	<b>1160</b>
30	54	54	1080

e) Influence de la nature du polymère sur l'activité catalytique

Les paragraphes précédents ont permis de déterminer les conditions optimales de temps, de concentrations et de pH pour réaliser l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one. Nous nous proposons maintenant d'étudier l'influence de la nature des polymères sur les rendements obtenus pour cette même oxydation de BV. Sept polymères, préalablement caractérisés par RMN <sup>1</sup>H, ont ainsi été utilisés pour catalyser l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one par O<sub>2</sub> dans les conditions décrites précédemment.

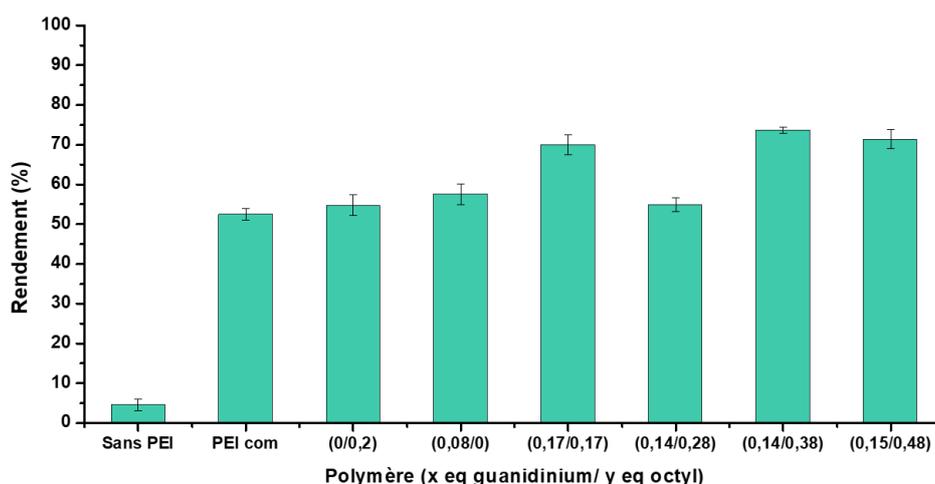


Figure 92 : Rendement global de l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en présence de de FMN (5 μM) NADH (1mM) et de différents PEI (5 mM) en solution tamponnée à pH = 8,5 (20 mM CHES) à température ambiante et sous pression atmosphérique durant 10 h.

La Figure 92 montre que la nature des polymères influence peu les rendements obtenus. En effet, les rendements obtenus pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one sont relativement similaires, quelles que soient les proportions en groupements octyle et/ou guanidinium greffés sur le polymère. Si le polymère commercial est utilisé en remplacement d'un polymère fonctionnalisé, la réaction se produit avec un rendement très légèrement inférieur (55%). Ces résultats confirment de nouveau que le polymère commercial permet lui aussi l'interaction de la FMN avec NADH, en facilitant le transfert d'ions hydrure et également en favorisant l'interaction entre l'espèce active et le substrat.

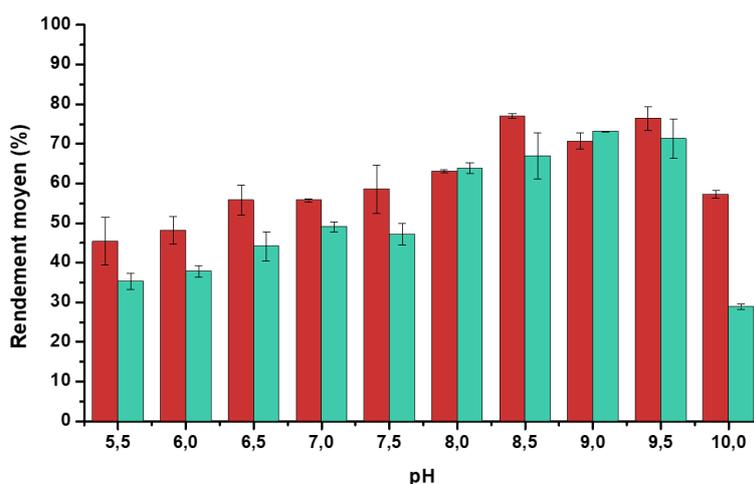


Figure 93 : Formation des lactones 1 et 2 en fonction du pH, par oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en présence de FMN (5 μM) PEI (5 mM) NADH (1mM), en solution tamponnée MES 20 mM, pH 5,5 – 6,5, HEPES 20 mM, pH = 7 - 8 ) ou CHES 20 mM, pH = 8,5 – 10, durant 10 h, à température ambiante et sous pression atmosphérique pour le PEI<sub>ref</sub> et PEI<sub>mago 38</sub>.

Le polymère trifonctionnalisé octyle/guanidinium/acide carboxylique a également été comparé au polymère de référence. La Figure 93, ci-dessus, montre les rendements obtenus pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one en fonction du pH avec un polymère trifonctionnalisé ( $PEI_{\text{mago}}$  38) et le polymère de référence. L'efficacité pour l'oxydation est légèrement meilleure après l'ajout de groupements carboxylate sur un polymère bifonctionnalisé guanidinium/octyle. Les travaux d'Imada sur une flavine modifiée en position N<sub>3</sub> par une chaîne peptidique montrent par des calculs DFT que l'efficacité de la réaction dépend de la présence d'un groupement acide carboxylique qui peut stabiliser l'intermédiaire peroxyflavine via un réseau de liaisons hydrogène.<sup>[111]</sup> Sur la base de ces travaux, l'amélioration du rendement peut être due à la stabilisation par liaison hydrogène de l'espèce active qui est susceptible de se former au cours de la réaction (Figure 94). Cependant, il est difficile de conclure sur cette hypothèse au vu de la faible amélioration des rendements entre les deux polymères. De plus, à ce jour, nous n'avons pas réussi à observer la formation de cet intermédiaire (hydro)peroxyflavinique. Une étude plus approfondie des conditions de modification des polymères devrait nous permettre de greffer une proportion de groupements carboxylate plus importante favorisant peut-être les interactions entre l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine et les groupements carboxylate et donc sa stabilité.

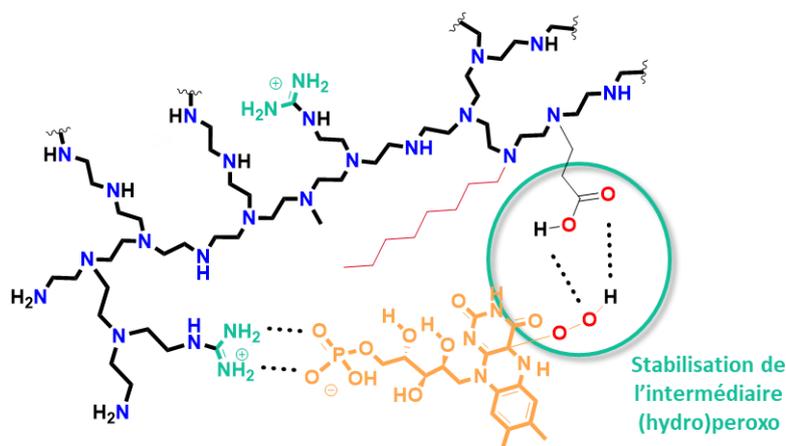


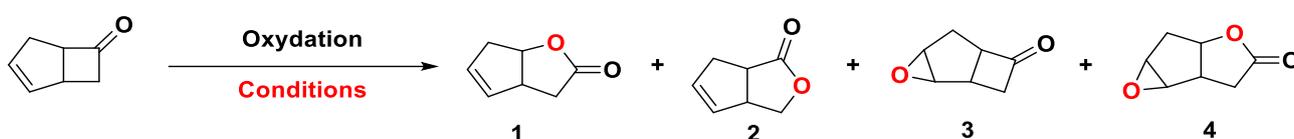
Figure 94 : Représentation schématique d'un polymère trifonctionnalisé octyle, guanidinium et acide carboxylique avec la potentielle stabilisation d'un intermédiaire peroxy sur la flavine incorporée au polymère

#### f) Comparaison avec des oxydants chimiques classiques.

A titre de comparaison, la réaction de Baeyer-Villiger a également été effectuée en utilisant des oxydants classiques tels que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et *m*CPBA (Tableau 17). L'utilisation d'une quantité sur-stœchiométrique de peroxyde d'hydrogène (2,4 équivalents), dans l'acide acétique, donne un

mélange de lactone **1** et **2** avec un rendement de 91% et une très bonne sélectivité de 85% pour la lactone **1**. En revanche, pour la réaction réalisée dans le méthyl tert-butyl éther (MTBE) à 30 °C avec *m*CPBA (1,5 eq), la sélectivité est seulement de 29% pour la lactone **1**, malgré un excellent rendement. Ainsi, le système biomimétique (PEIm-FMN) utilisant O<sub>2</sub> dans l'eau apparaît comme une alternative prometteuse pour réaliser des réactions avec de très bons rendements proches de 80% à pH basique, et une sélectivité comparable à celle obtenue avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tableau 17 : Oxydation biomimétique ou chimique de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one.



Conditions	rendement	Sélectivité			
		1	2	3	4
FMN / NADH / PEI / pH = 6,7 <sup>a</sup>	47%	100	0	0	0
FMN / NADH / PEI / pH = 8,5 <sup>a</sup>	80%	80	20	0	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2,4 eq), acide acétique <sup>b</sup>	91%	85	15	0	0
<i>m</i> CPBA (1,5 eq), MTBE 30 °C	95%	29	0	34	37

<sup>a</sup> Rendement déterminé par GC, [FMN] = 5 μM, [PEI] = 5 mM, [Substrat] = 10 mM, [NADH] = 1 mM. <sup>b</sup> rendement isolé en utilisant les condition de la référence <sup>[125]</sup>. <sup>c</sup> D'après la référence <sup>[128]</sup>.

Le rendement et la sélectivité obtenus pour la lactone **1** avec l'enzyme artificielle sont comparables aux résultats obtenus avec des flavines modifiées de la littérature. En 2005, l'équipe d'Imada a réussi l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one avec un rendement similaire, mais avec une très mauvaise sélectivité (47%).<sup>[108]</sup> Puis, plus récemment, ils ont obtenu un rendement de 80% avec une bonne sélectivité de 88% à l'aide d'un catalyseur supramoléculaire (Figure 39).<sup>[94]</sup> Cependant, ces systèmes utilisent soit des solvants organiques, soit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme oxydant et toujours avec des flavines modifiées, contrairement à l'enzyme artificielle, qui est fonctionnelle en solution aqueuse avec l'oxygène moléculaire. Ainsi, cette enzyme artificielle est le premier système

catalytique utilisant un cofacteur flavinique naturel non modifié pour activer le dioxygène dans l'eau et réaliser des réactions de type Baeyer-Villiger.

### 3. Champs d'application de l'enzyme artificielle

#### a) Réaction de Baeyer-Villiger

Nous avons montré que le système **PEIm-FMN-NADH** était capable d'activer le dioxygène et d'oxyder la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one dans l'eau avec de très bons rendements. Il serait donc intéressant de tester ce catalyseur sur d'autres cétones cycliques à 4, 5 ou 6 chaînons (Figure 95).

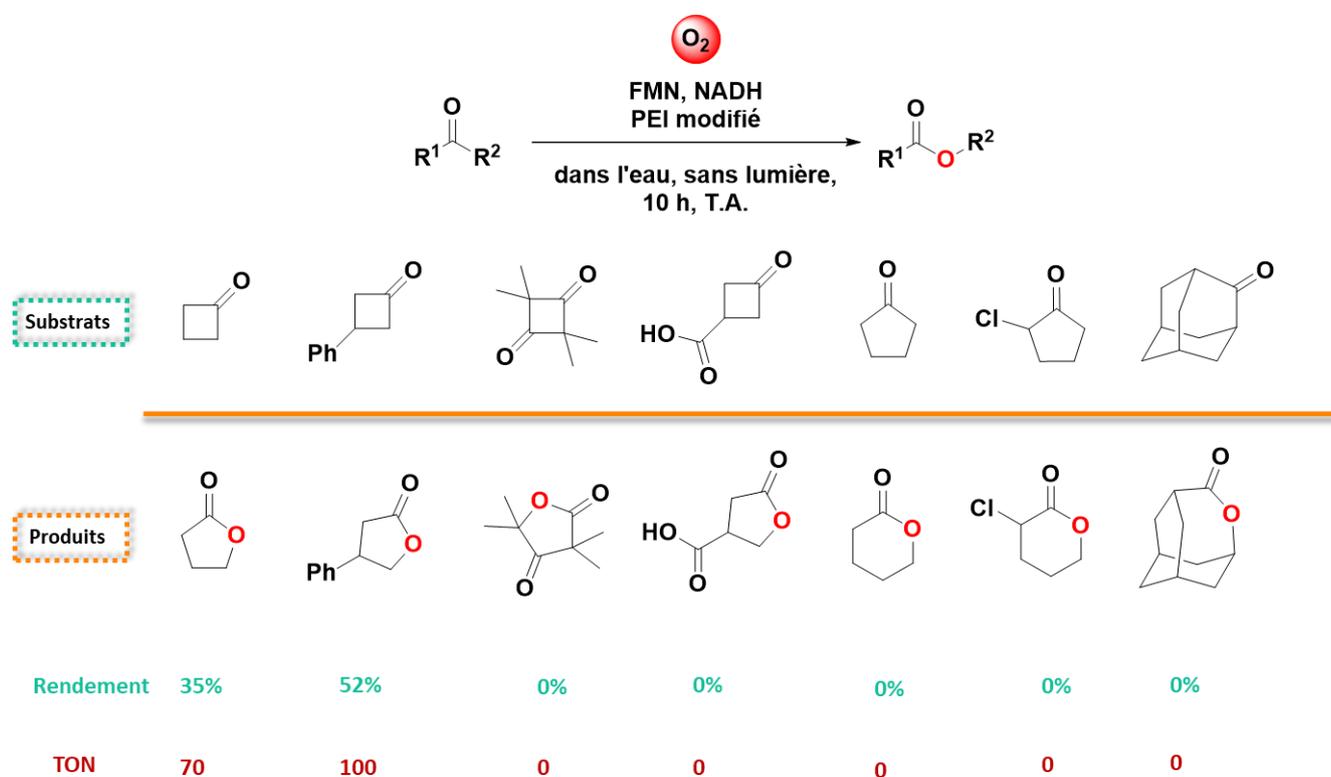


Figure 95 : Oxydation de Baeyer-Villiger de divers cyclobutanones avec l'enzyme artificielle (FMN = 5  $\mu$ M, PEI<sub>ref</sub> = 5 mM) en présence de NADH (1 mM), Substrat (10 mM), en solution tamponnée à pH = 8,5 (20 mM de CHES) durant 10 h, à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Un premier problème se pose : la solubilité de certains substrats. L'adamantanone et la 2,2,4,4-tetraméthylcyclobutane-1,3-dione sont des composés solides, insolubles dans l'eau, ce qui ne permet pas au système d'oxyder ces substrats. En effet, en fin de réaction, l'intégralité du produit de départ est récupérée. La réactivité des composés est aussi un paramètre à prendre en compte puisque les cycles à 5 carbones, tels que la cyclopentanone ou la 2-chlorocyclopentanone, sont des

substrats avec un cycle moins tendu que les cyclobutanones et sont donc plus difficiles à oxyder. Dans le cas de la cyclopentanone, aucune réactivité n'est observée. Concernant la 2-chlorocyclopentanone, un autre problème apparaît, puisque qu'en solution aqueuse, le composé se dégrade en acide 5-oxopentanoïque au cours du temps.<sup>[126]</sup> Finalement, uniquement les dérivés de cyclobutanones sont assez réactifs pour être oxydés.

La cyclobutanone est oxydée avec un rendement de 35%. La substitution de la position 3, par un groupement électroattracteur (- I), permet d'améliorer le rendement de la réaction à 52% pour la 3-phenylcyclobutanone. En revanche, l'ajout d'un groupement carboxylate en position 3 inhibe complètement la réaction malgré une excellente solubilité et l'intégralité du produit de départ est récupéré en fin de réaction.

#### **b) Réaction de sulfoxydation**

En reprenant les conditions développées pour la réaction de Baeyer-Villiger, l'enzyme artificielle a par la suite été utilisée pour des réactions de sulfoxydation sur divers thioéthers. Les résultats de la Figure 96 montrent que l'oxydation du dithiane en mono-sulfoxyde est favorable avec un bon rendement de 60% et aucune trace de di-oxydation ou de suroxydation en di-sulfoxyde ou en sulfone. L'oxydation du thioanisole est quant à elle moins favorable avec un rendement très faible en sulfoxyde (10%). Toutes les autres tentatives de sulfoxydation des thioéthers aliphatiques se sont soldées par un échec, notamment à cause des problèmes de solubilité, d'évaporation ou tout simplement de réactivité.

Il est important de noter que pour tous les substrats testés, les réactions de contrôle en absence de polymère n'ont montré aucune réactivité et aucun produit d'oxydation n'a été observé.

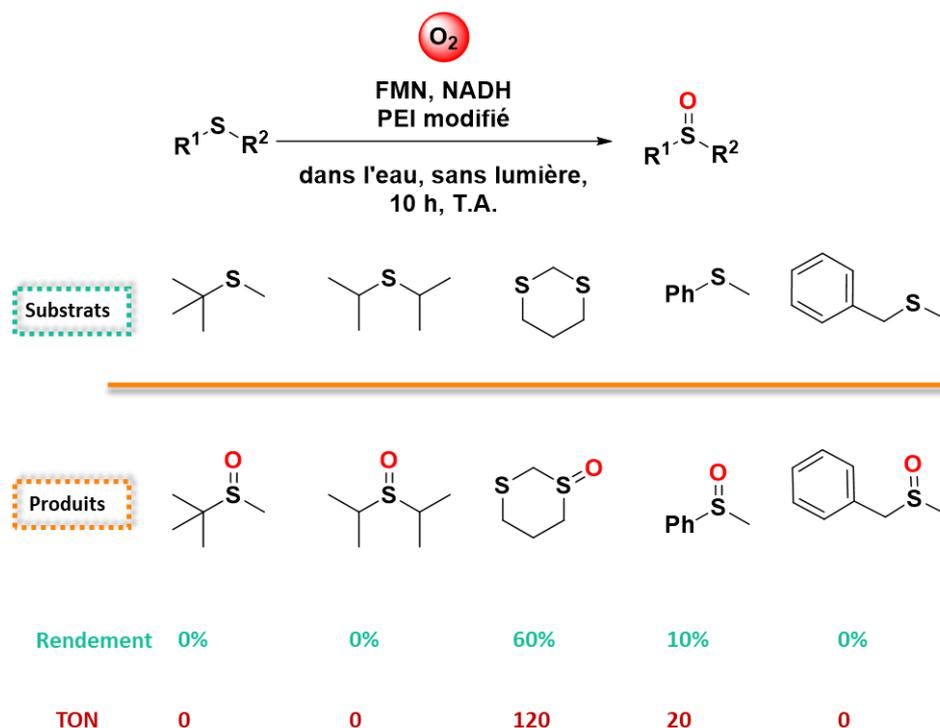


Figure 96 : Oxydation de divers sulfures avec l'enzyme artificielle (FMN = 5  $\mu$ M, PEI<sub>ref</sub> = 5 mM) en présence de NADH (1 mM), Substrat (10 mM), en solution tamponnée à pH = 8,5 (20 mM de CHES) durant 10 h, à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Pour résumer, nous avons montré que l'incorporation de FMN dans l'environnement localement polarisé et hydrophobe du polymère permettait à ce cofacteur flavinique de collecter efficacement les électrons de NADH et d'activer par la suite le dioxygène pour réaliser des réactions d'oxydation de Baeyer-Villiger ou de sulfoxydations avec de bons rendements, mais le système reste limité à quelques substrats particuliers.

#### 4. Etude mécanistique

Toujours dans l'optique d'approfondir l'étude du système, des réactions de contrôles avec le peroxyde d'hydrogène, ainsi qu'un suivi de sa formation et/ ou consommation ont permis d'en apprendre plus sur le fonctionnement de l'enzyme artificielle.

L'oxydation du substrat modèle bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one a tout d'abord été réalisée avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en remplacement du système PEIm-FMN-NADH. La Figure 97 montre une amélioration du rendement d'environ 20% quel que soit le pH utilisé, avec un maximum de 90% à pH 9,5. Dans ce cas, la même sélectivité est observée concernant la formation des lactones 1 et 2 avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces résultats

ne sont en aucun cas étonnant, puisque le peroxyde d'hydrogène est un oxydant largement décrit dans la littérature pour réaliser ce genre d'oxydation en chimie organique. Cependant, à la suite de ce résultat, une première question se pose, est-ce  $H_2O_2$  ou un intermédiaire (hydro)peroxyflavine qui réalise l'oxydation lors des réactions catalysées par l'enzyme artificielle ?

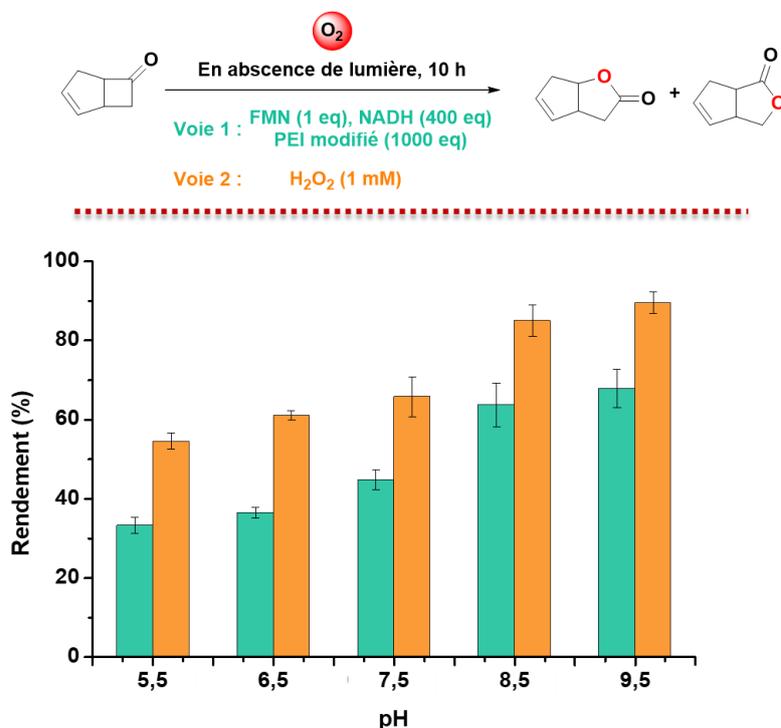


Figure 97 : Rendement total en lactone 1 et 2 en fonction du pH lors de l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) par  $H_2O_2$  (1mM) ou avec l'enzyme artificielle (FMN (5  $\mu$ M), PEI<sub>ref</sub> (5 mM)), en présence de NADH (1 mM), en solution tamponnée MES 20 mM (pH 5.5 - 6.5), HEPES 20 mM (pH = 7 - 8) ou CHES 20 mM (pH = 8.5 - 10), à température ambiante et sous pression atmosphérique durant 10 h.

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons décidé de suivre la concentration en peroxyde d'hydrogène dans différentes conditions réactionnelles grâce à des languettes de mesure sensibles à la concentration en peroxyde que l'on peut utiliser directement dans la solution aqueuse (Quantofix®). La Figure 98A montre l'évolution de la concentration en peroxyde d'hydrogène au cours du temps : soit durant une réaction avec le système complet (Polymère, FMN, NADH et substrat) (triangles rouges), soit en absence du substrat (cercle verts), ou en absence de polymère (carrés noir).

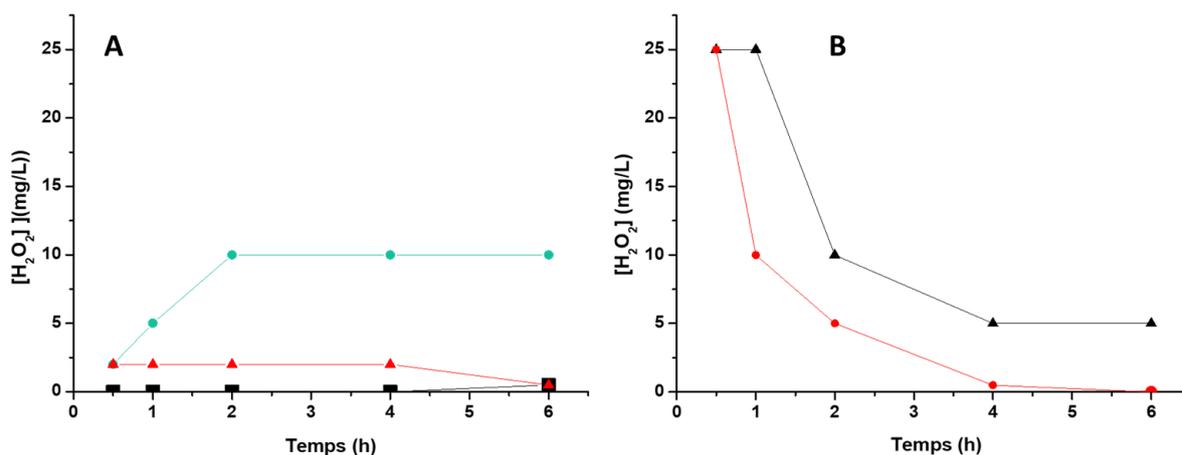


Figure 98 : A) Cinétique de la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de FMN (5 μM) et de NADH (1 mM) (■), de FMN (5 μM), NADH (1 mM) et PEI<sub>ref</sub> (5 mM), (●), de FMN (5 μM), NADH (1 mM), PEI<sub>ref</sub> (5 mM), et bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM), (▲), en solution tamponnée à pH = 8,5 (CHES 20 mM), à température ambiante et sous pression atmosphérique. B) Cinétique de consommation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one uniquement (10 mM) (▲) et ou de PEI<sub>ref</sub> (5 mM) et de bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) (●).

La première information à tirer de la Figure 98 est qu'en absence de polymère, le mélange NADH-FMN ne produit pas ou très peu de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce résultat est en accord avec ceux précédemment obtenus, montrant que NADH seul n'est pas en mesure de réduire la FMN. Concernant les enzymes de type BVMO, nous avons montré dans la partie bibliographique qu'en absence d'un substrat, l'intermédiaire (hydro)peroxy formé libérait une molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour redonner la flavine oxydée (processus de découplage). Le même processus se produit lorsque la FMN et le NADH sont mis en présence du polymère où on observe la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mg/L). On peut donc fortement supposer que, dans ce cas, l'intermédiaire peroxyflavinique se forme pour conduire ensuite à la libération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la régénération du cofacteur flavinique jusqu'à consommation totale de NADH. En revanche, lorsque le substrat est ajouté au milieu réactionnel, il y a toujours formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais en concentration moins importante (2,5 mg/L) que lors de la réaction en absence du substrat, pour laquelle la concentration en peroxyde d'hydrogène reste constante après formation. Il est donc légitime de supposer que l'intermédiaire peroxyflavine se forme, puis qu'une compétition entre l'oxydation du substrat par cette espèce et la libération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mette en place. Il est également possible que l'intermédiaire peroxyflavine ne réagisse pas avec le substrat, mais que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libéré réagisse rapidement avec le substrat et ne puisse pas s'accumuler en solution (Figure 99).

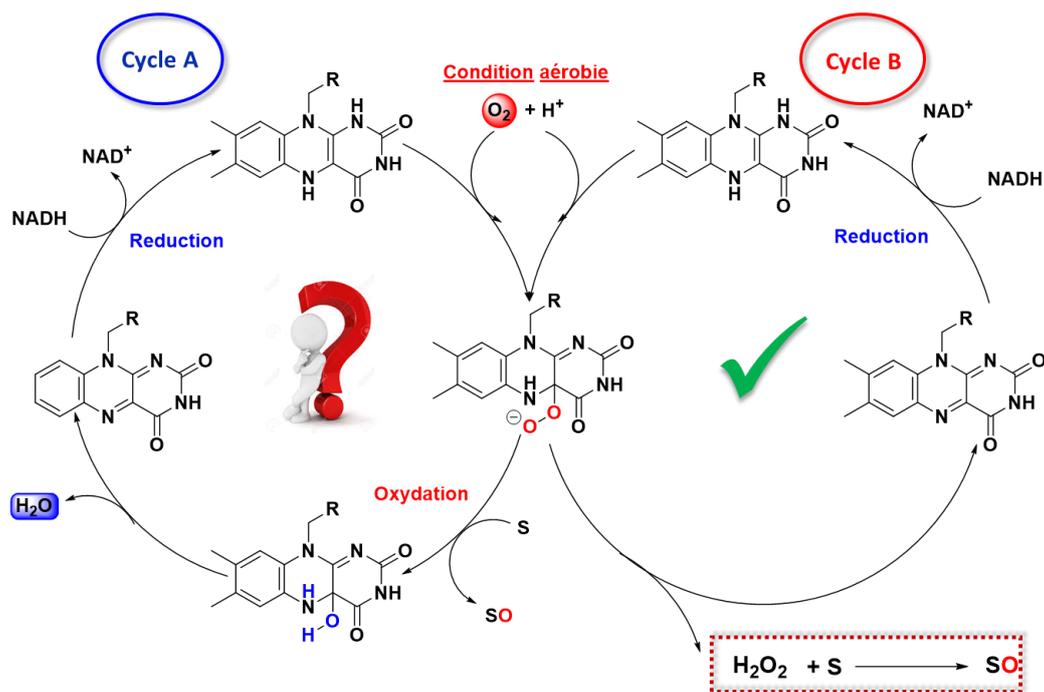


Figure 99 : Représentation schématique du mécanisme possible avec l'enzyme artificielle.

Afin de valider cette hypothèse, la réaction est effectuée en présence d'une catalase (une oxydoréductase qui catalyse la dismutation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  de façon très efficace), qui devrait consommer la totalité du peroxyde d'hydrogène formé et devrait donc inhiber la réaction si celle-ci était réalisée par le  $\text{H}_2\text{O}_2$  libéré en solution. Or, après réaction, un rendement de 60% en lactones est obtenu, ce qui laisse supposer que l'oxydation se fait soit majoritairement via le  $\text{H}_2\text{O}_2$  généré au sein du polymère, soit une grande partie de la réaction est réalisée directement par l'intermédiaire peroxyflavine, comme c'est le cas pour les BVMOs (Figure 100).

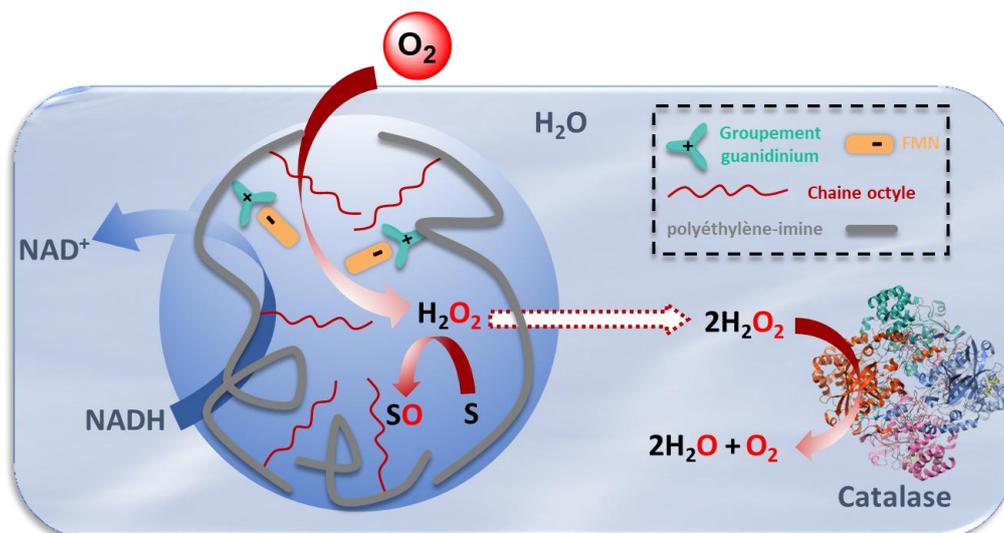
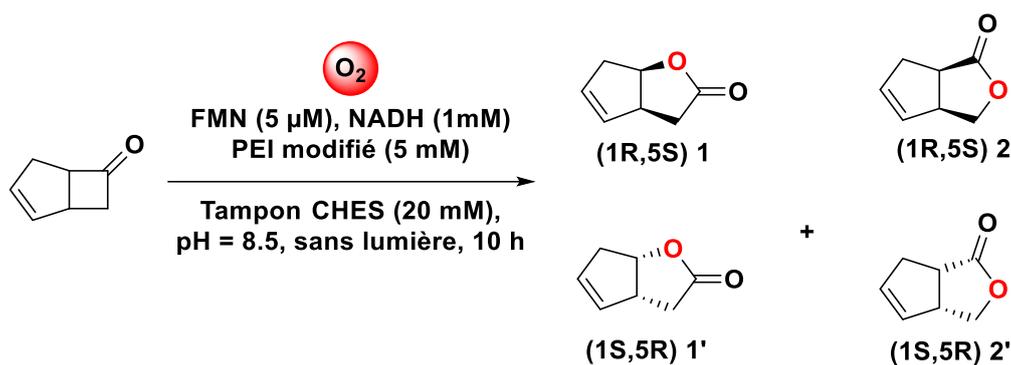


Figure 100 : Représentation schématique de la réactivité supposée de l'enzyme artificielle en présence de catalase.

### 5. Utilisation du polymère chiral pour la catalyse d'oxydation

Le paragraphe précédent a permis de mettre en évidence l'efficacité de l'enzyme artificielle pour favoriser les réactions d'oxydation des cyclobutanones ou des thioéthers au sein de ses « sites actifs ». Or, un polymère chiral a été synthétisé au préalable avec des groupements bis-naphtalène. Il était donc intéressant d'utiliser ce polymère pour essayer de catalyser l'oxydation énantiosélective de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one. En reprenant les meilleures conditions réactionnelles mises au point pour les réactions de Baeyer-Villiger, l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one est donc réalisée avec le polymère chiral.

Tableau 18 : Réaction d'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) catalysée en présence de polymère chiral.



PEI	Rendement (%) <sup>a</sup>	1 : 2	ee 1 (%)	ee 2 (%)
PEI <sub>com</sub>	52 ± 1	83 : 17	rac	rac
PEI <sub>ref</sub>	70 ± 3	85 : 15	rac	rac
PEI <sub>mgo</sub> 5 (0,17/0,41)	72 ± 4	82 : 18	rac	rac
PEI chiral	67 ± 1	88 : 12	<b>3,5</b>	rac

<sup>a</sup> Rendement déterminé par GC, [FMN] = 5  $\mu\text{M}$ , [PEI] = 5 mM, [Substrat] = 10 mM, [NADH] = 1 mM.

Les résultats du Tableau 18 montrent les rendements ainsi que les excès énantiomériques obtenus pour différents polymères, dont le polymère chiral. La première information importante à ressortir de ces résultats est qu'en changeant le polymère fonctionnalisé guanidinium/octyle par le polymère chiral, il n'y a pas de perte de rendement. Une autre information est qu'aucun excès énantiomérique n'est observé lorsque la réaction est effectuée avec les polymères non chiraux (PEI<sub>com</sub>, PEI<sub>ref</sub> ou PEI<sub>mgo</sub> 5). Un très faible excès énantiomérique est en revanche observé de façon reproductible lors de l'utilisation du polymère chiral pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one. Ce résultat indique que le polymère fonctionnalisé par des groupements naphthalènes est capable d'induire une légère chiralité. Le problème du faible taux de greffage du bi-naphthalène ajouté à la répartition aléatoire des groupements lors de la synthèse des polymères, peuvent expliquer les faibles excès énantiomériques obtenus avec ce système.

### III. Conclusion

Globalement, l'incorporation de la FMN au sein d'un polymère fonctionnalisé par des groupements octyle/ guanidinium a permis d'oxyder efficacement le NADH. Une fois réduit, le cofacteur flavinique FMNH<sub>2</sub> s'est avéré capable d'activer le dioxygène et de réaliser l'oxydation de divers substrats (cyclobutanones et thioéthers), devenant ainsi le premier système avec une flavine naturelle capable de réaliser des réactions d'oxydation en solution aqueuse par l'oxygène moléculaire. Les résultats obtenus en catalyse d'oxydation sont relativement modestes pour certains substrats, avec des rendements de 10 et de 35% pour le thioanisole et la cyclobutanone respectivement. En revanche, de meilleurs rendements sont obtenus pour le dithiane (60%), la 3-phenyl-cyclobutanone (52%) et la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (70%), dont la lactone correspondante a été obtenue avec une très bonne sélectivité. Un rendement de 82% a également été obtenu pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one avec 2 mM de NADH.

Ces résultats prometteurs ont ensuite été comparés avec les résultats obtenus avec des oxydants chimiques plus classiques, ainsi qu'en présence des systèmes utilisant des flavines modifiées. Cela a permis de mettre en évidence les avantages de cette enzyme artificielle par rapport aux systèmes déjà existants. Pouvoir travailler en solution aqueuse, à pression atmosphérique et à température ambiante tout en utilisant l'oxygène de l'air comme oxydant sont les principaux avantages de ce système qui permet au final de réaliser des oxydations dans des conditions particulièrement douces.

Les études préliminaires sur le mécanisme nous laissent supposer que l'intermédiaire (hydro)peroxoflavine catalyse au moins une partie de la réaction, malgré la formation de peroxyde d'hydrogène *in situ*. Cependant, le système se limite actuellement à l'oxydation de substrats réactifs tels que des cyclobutanone activées. A cet égard, il serait intéressant d'arriver à stabiliser l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine, en travaillant sur la fonctionnalisation du polymère, notamment sur le greffage des groupements carboxylate qui ont déjà montrés des résultats prometteurs malgré un faible taux de greffage. Cela permettrait peut-être de favoriser l'oxydation d'autres substrats (cyclopentanone, cyclohexanone ...).

Enfin, les résultats préliminaires obtenus avec le polymère chiral suggèrent que ce dernier arrive à induire une faible stéréosélectivité lors de l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one. Afin d'obtenir des excès énantiomériques plus prononcés, greffer une proportion plus importante de

groupements chiraux ou greffer une flavine au sein d'un polymère chiral par liaison covalente permettrait peut-être à l'espèce active de se trouver directement à proximité d'un site chiral. L'utilisation de flavine chirales greffées ou non au sein du polymère, pourrait également être une solution pour favoriser l'induction d'une énantiosélectivité.

Malgré une très bonne spécificité pour la FMN le NADH est un réducteur coûteux et peu adapté pour la chimie organique à grande échelle. C'est pourquoi, dans le chapitre suivant nous nous efforcerons de trouver une alternative, en cherchant soit à le remplacer par un réducteur moins cher, soit en le régénérant par diverses méthodes compatibles avec notre système.



## **Chapitre 4 : Evolution des conditions catalytiques**

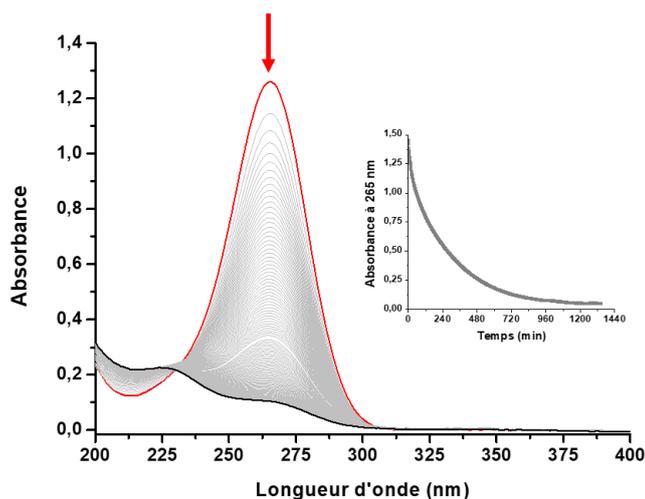
Au cours des chapitres précédents, nous avons démontré que le NADH pouvait transférer ses électrons de façon efficace à la FMN lorsque cette dernière était incorporée au sein d'un polyéthylèneimine modifié et soluble dans l'eau. L'utilisation du même système en conditions aérobie a ainsi permis de catalyser des réactions d'oxydation efficaces en utilisant directement le dioxygène de l'air comme oxydant. Cependant, le coût élevé du NADH (165 000 €/Kg) est prohibitif pour son utilisation en quantité stœchiométrique lors des réactions étudiées. Deux solutions ont ainsi été envisagées pour remédier à ce problème : remplacer NADH par un autre réducteur moins coûteux ou le régénérer en solution au cours de la réaction.

### **I. Remplacement du NADH par l'ascorbate de sodium**

Notre objectif est de trouver un réducteur sacrificiel compatible avec le système en remplacement du NADH, qui présente un coût trop important pour la catalyse à grande échelle. Notre choix s'est ainsi tout naturellement tourné vers l'utilisation de l'ascorbate de sodium, qui est un réducteur hydrosoluble, peu coûteux (250 €/Kg), respectueux de l'environnement et qui a déjà été décrit dans la littérature pour réduire des sels de flaviniums.

#### **1. Etude spectroscopique**

L'oxydation de l'ascorbate de sodium par la FMN a tout d'abord été étudiée en solution aqueuse et en présence d'oxygène, en suivant la décroissance de la bande caractéristique de sa forme réduite à 265 nm. Ainsi, lorsque 200 équivalents d'ascorbate sont ajoutés à une solution de FMN et de polymère modifié dans l'eau non tamponnée, cette bande décroît et disparaît presque intégralement après 16 h de réaction. Ceci démontre clairement que le système **PEIm-FMN** est capable d'oxyder l'ascorbate de sodium de façon catalytique (Figure 101).



**Figure 101 : Evolution en fonction du temps du spectre d'absorbance de l'ascorbate de sodium ( $100 \mu\text{M}$ ) dans l'eau en présence de FMN ( $0,5 \mu\text{M}$ ) et de  $\text{PEI}_{ref}$  ( $0,5 \text{ mM}$ ) ; (—)  $t = 0$ , (---)  $t_{final} = 1200 \text{ min}$ . Encart : décroissance de l'absorbance maximale à  $265 \text{ nm}$  en fonction du temps.**

Plusieurs contrôles ont ensuite été réalisés. Ainsi, l'ascorbate de sodium seul en solution aqueuse, ne s'oxyde que lentement en présence d'oxygène. Par ailleurs, les vitesses initiales mesurées, en suivant les cinétiques de disparition de l'ascorbate de sodium à  $265 \text{ nm}$ , ne montrent aucune influence de la nature du polymère sur l'oxydation de l'ascorbate par une quantité catalytique de FMN. L'ajout d'un substrat (bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one) ne permet pas non plus d'améliorer la cinétique d'oxydation de l'ascorbate de sodium (Figure 102). Il semble donc que l'ascorbate soit suffisamment réducteur pour réduire la FMN incorporée au polymère en solution aqueuse.

## Chapitre 4 : Evolution des conditions catalytiques

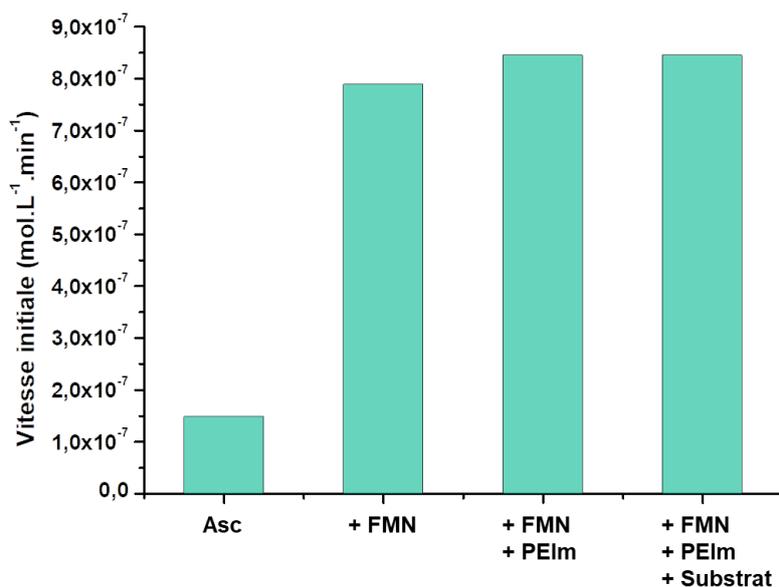


Figure 102 : Vitesse d'oxydation, mesurée à partir de l'absorbance à 265 nm, d'une solution d'ascorbate de sodium 100  $\mu\text{M}$  dans l'eau seul ou en présence de FMN (0,5  $\mu\text{M}$ ), ou de FMN (0,5  $\mu\text{M}$ ) et de PEI<sub>ref</sub> (0,5 mM) ou enfin de FMN (0,5  $\mu\text{M}$ ), de PEI<sub>ref</sub> (0,5 mM) et de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (1 mM).

Les résultats précédents avec l'ascorbate de sodium ont tous été obtenus dans l'eau distillée et il était intéressant d'étudier l'influence du pH sur l'activité de ce nouveau système. Nous avons pour cela utilisé différents tampons : MES (pH = 5,5-6,5), HEPES (pH = 7-8) et CHES (pH = 8,5), déjà utilisés pour l'étude avec NADH. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 103.

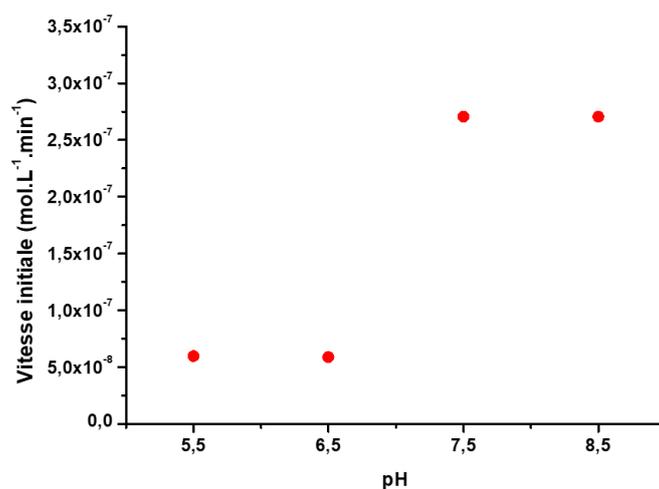


Figure 103 : Vitesse initiale de l'oxydation de l'ascorbate de sodium (100  $\mu\text{M}$ ) mesurée à partir de l'absorbance à 265 nm en fonction du pH, dans une solution aqueuse de FMN (0,5  $\mu\text{M}$ ) et de PEI<sub>ref</sub> (0,5 mM) (●).

Ainsi, les résultats obtenus pour l'oxydation de l'ascorbate de sodium en fonction du pH sont très différents de ceux obtenus avec le NADH. A pH acide, on observe une vitesse d'oxydation environ 5 fois moins rapide qu'à pH légèrement basique. Cela peut s'expliquer grâce aux espèces présentes en solution aux différents pH. En effet, il est connu que l'acide ascorbique ( $AH_2$ ) (couple  $AH_2/A^{\bullet-}$ ,  $E^0 = 0,72$  V) possède un pouvoir réducteur moins important que l'ascorbate ( $AH^-$ ) (couple  $AH^-/A^{\bullet-}$ ,  $E^0 = 0,3$  V), donc moins efficace pour réduire la FMN.<sup>[127-130]</sup> Or, à pH acide, la forme  $AH_2$  est majoritaire, expliquant ainsi la différence de vitesse d'oxydation entre pH acide et légèrement basique ( $pK_a = 4,04$ ).

Le fait que l'ascorbate de sodium soit capable, comme le NADH, de réduire la FMN en  $FMNH_2$  suggère que le système ascorbate de sodium/FMN soit capable lui aussi de conduire, en présence d'oxygène, à l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine. Toutes les conditions sont donc réunies pour que l'association de l'ascorbate de sodium, avec la FMN incorporée dans le polymère, puisse reproduire l'activité des monooxygénases. La réaction d'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one a donc été étudiée en présence de ce nouveau système.

## 2. Catalyse d'oxydation avec l'ascorbate de sodium

L'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one a donc été réalisée en présence de 5  $\mu$ M de FMN, 5 mM de polymère et 1 mM d'ascorbate de sodium. Dans ce cas, le rendement en lactone, toujours calculé par rapport à la quantité de réducteur, est seulement de 30% et de 8% pour le contrôle sans polymère après 10 heures de réaction (Figure 104). Tout comme avec NADH, seules les lactones 1 et 2 sont obtenues en fin de réaction et aucune trace du produit d'époxydation n'est observée.

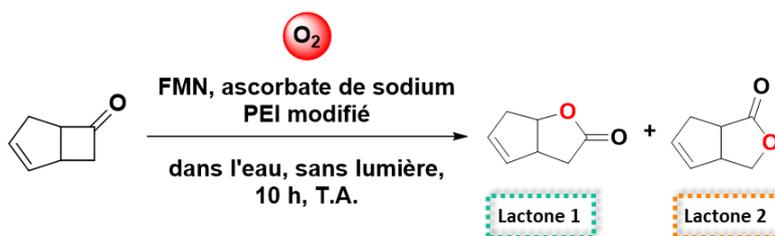


Figure 104 : Oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en présence de l'enzyme artificielle composée de FMN (5  $\mu$ M),  $PEI_{ref}$  (5 mM), ascorbate de sodium (1 mM), en solution tamponnée à pH = 8,5 (20 mM CHES), à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Ce rendement est assez faible, mais il s'agit d'une réaction d'oxydation dans l'eau, utilisant O<sub>2</sub>. C'est donc un résultat suffisamment intéressant pour poursuivre avec ce nouveau système. A présent, il est primordial de trouver les meilleures conditions réactionnelles afin de déterminer si ce système est capable d'oxyder plus efficacement la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one et également s'il est capable d'oxyder d'autres substrats.

La cinétique d'oxydation a donc été étudiée avec l'ascorbate de sodium en tant que réducteur (Figure 105). Les résultats montrent qu'un temps de réaction beaucoup plus long (48 h) est nécessaire avec ce système, par rapport au système utilisant NADH comme réducteur, pour atteindre un rendement maximal de 65% en lactone 8 fois supérieur à celui obtenu lors de la réaction contrôle sans polymère. Il apparaît donc ainsi que la cinétique de formation des lactones lors de cette réaction (Figure 105) n'est pas cohérente avec la cinétique de d'oxydation de l'ascorbate de sodium déterminé lors des analyses par spectroscopie UV-visible (Figure 101). Il semblerait donc que ce système ait recours à un mécanisme légèrement différent pour la formation de l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine. Ce point sera développé plus tard dans ce chapitre.

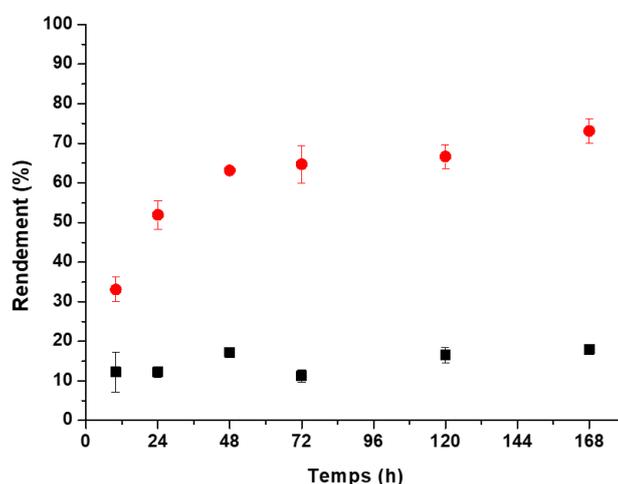


Figure 105 : Cinétique de formation des lactones 1 et 2 catalysée par l'enzyme artificielle constituée de (FMN : 5 µM, PEI<sub>ref</sub> : 5 mM) (●) ou FMN (5 µM) (■) en présence d'ascorbate de sodium (1 mM), bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en solution tamponnée à pH = 8,5 (20 mM CHES), à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Toujours dans l'optique de mieux comprendre comment fonctionne le système, l'influence du pH a également été étudiée. La Figure 106 montre les rendements obtenus après 48h pour

l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one sur une gamme de pH allant de 5,5 à 10. Les premières informations à tirer suite à ces résultats sont qu'à pH acide, au même titre qu'avec NADH, seule la lactone **1** est produite avec un rendement maximal de 35% à pH = 7,0. A pH basique, les lactones **1** et **2** sont observées avec une sélectivité de 90% pour la lactone **1** et un rendement maximal de 70% à pH = 8,5.

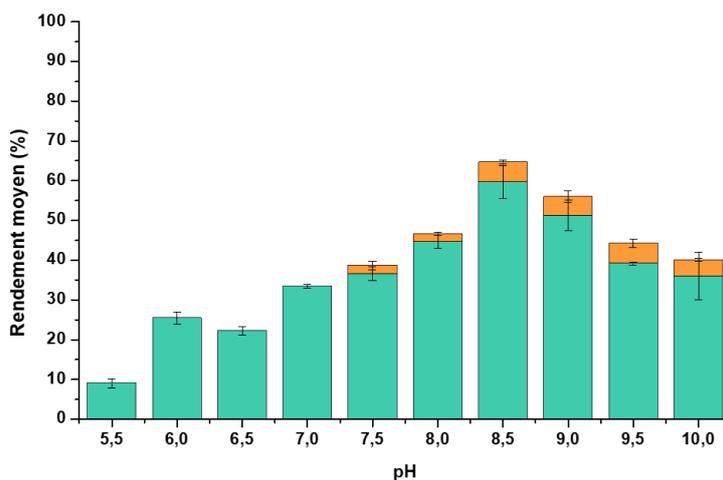


Figure 106 : Profil de pH de la formation des lactones **1** et **2** en présence de FMN (5  $\mu$ M),  $PEI_{ref}$  (5 mM), ascorbate de sodium (1mM), en solution tamponnée à pH 5,5 – 6,5 (MES 20 mM), à pH = 7 - 8 (HEPES 20 mM) ou à pH = 8,5 - 10 (CHES ou 20 mM), 10 mM de bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one, durant 48h, à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Pour essayer de mieux comprendre le système, nous avons également suivi la formation et la consommation du peroxyde d'hydrogène en fonction du temps. Les mesures de la Figure 107 révèlent que lors des 24 premières heures de réaction, le système polymère – FMN en présence d'ascorbate produit également  $H_2O_2$  (2 mg/L), qui est ensuite consommé pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one. Au vu de ces résultats, il apparaît que ce nouveau système se comporte de manière similaire au système utilisant NADH comme réducteur.

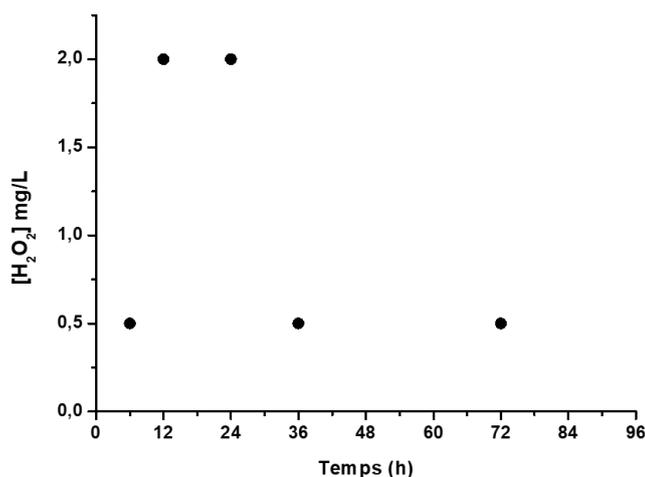


Figure 107 : Cinétique de la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de FMN (5 μM), d'ascorbate de sodium (1 mM), de PEI<sub>ref</sub> (5 mM) et de bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM), en solution tamponnée à pH = 8,5 (20 mM CHES) à température ambiante et sous pression atmosphérique. Concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg/L) en fonction du temps.

L'intérêt principal d'utiliser l'ascorbate de sodium à la place de NADH est son coût excessivement moins élevé que celui du NADH. C'est pourquoi une série de réactions a été réalisée en augmentant les proportions de réducteur afin d'essayer d'obtenir une conversion totale pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one.

Tableau 19 : Rendement, conversion et TON pour la réaction de Baeyer-Villiger utilisant la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) comme substrat en présence de FMN (5 μM), PEI<sub>ref</sub> (5mM) et de concentrations croissantes en ascorbate de sodium, en solution tamponnée à pH = 8,5 (CHES 20 mM) à température ambiante et sous pression atmosphérique durant 48h

Ascorbate (mM)	Rendement (%) <sup>a</sup>	Conversion (%)	TON
1	65	7	140
2	47	9	180
4	28	11	220
6	20	11	220
8	15	12	240
10	12	12	240
15	12	12	240
20	12	12	240
30	12	12	240

<sup>a</sup> Rendement déterminé par GC par rapport à l'ascorbate de sodium, [FMN] = 5 μM, [PEI] = 5 mM, [bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one] = 10 mM, [Asc] = x mM.

L'augmentation de la concentration en ascorbate de sodium à 2 mM ne permet pas d'améliorer le rendement de catalyse qui passe de 65% à 1 mM à 47% à 2 mM. Au contraire, le

Le système est même beaucoup moins performant avec une baisse du rendement jusqu'à 12% lorsque l'ascorbate est utilisé en quantité stœchiométrique par rapport au substrat. Cela correspond donc à une conversion de 12% qui plafonne, même pour des concentrations sur-stœchiométriques d'ascorbate. Ce comportement est différent de celui observé avec NADH pour lequel une conversion de 58% pouvait être obtenue en présence d'excès de NADH. Ces résultats peuvent cependant être rationalisés par le fait que NADH est un réducteur spécifique de la FMN et doit donc moins interférer avec le  $H_2O_2$  produit en cours de réaction. Ici, le peroxyde d'hydrogène formé est probablement plus susceptible d'être réduit par l'excès d'ascorbate de sodium présent dans le milieu, ce qui limite l'oxydation du substrat.<sup>[131]</sup> Cependant, les résultats à faible concentration en réducteur restent très encourageants, avec de bons rendements malgré des temps de réaction plus longs qu'avec le NADH. Des études supplémentaires seront nécessaires pour essayer de stabiliser l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine et ainsi s'affranchir du problème lié au peroxyde d'hydrogène.

Le système a ensuite été utilisé pour réaliser des réactions d'oxydation sur divers substrats organiques (cétones cycliques et sulfures). Les meilleures conditions mises en évidence pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one ont été reprises pour ces nouveaux substrats. Les rendements obtenus pour les différents substrats sont compilés dans la Figure 108. Globalement, le système polymère/FMN utilisant l'ascorbate de sodium en tant que réducteur permet d'oxyder les mêmes substrats que NADH, avec des rendements légèrement inférieurs, sauf pour l'oxydation de la cyclobutanone qui n'a pas abouti à la lactone correspondante, contrairement à la réaction avec NADH, mais des problèmes de reproductibilité avaient déjà été observés lors de cette réaction avec le NADH. Toutes les réactions de contrôle en absence de polymère n'ont montré aucun produit d'oxydation.

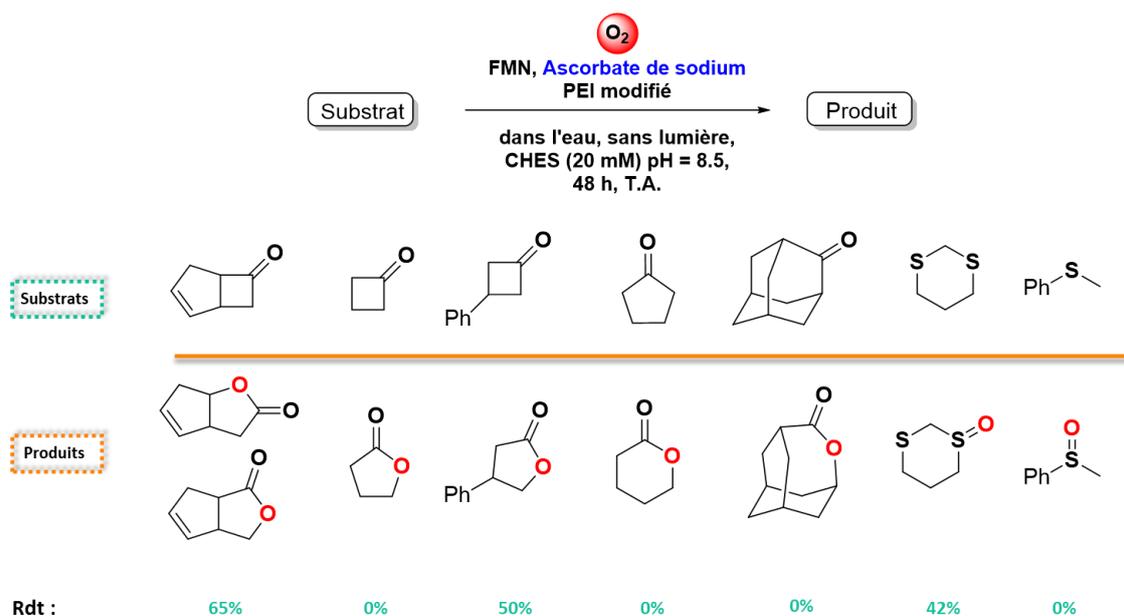


Figure 108 : Oxydation de divers substrats (cétones ou thioéthers) (10 mM) avec l'enzyme artificielle (FMN = 5  $\mu$ M, PEI<sub>ref</sub> = 5 mM) en présence d'ascorbate de sodium (1 mM), en solution tamponnée à pH = 8,5 (20 mM de CHES) durant 48 h, à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Pour résumer, nous avons démontré que l'ascorbate de sodium pouvait remplacer NADH afin de réduire la FMN enfouie au sein d'un polymère fonctionnalisé, pour catalyser, en présence de dioxygène, diverses réactions d'oxydation telles que Baeyer-Villiger et sulfoxydations. En revanche, l'ascorbate de sodium s'est avéré être peu efficace lors de son utilisation à de fortes concentrations en raison de sa réactivité directe avec le peroxyde d'hydrogène. L'ascorbate de sodium étant un réducteur à un électron, il paraît intéressant d'étudier de plus près sa réactivité avec la FMN, de façon à mieux comprendre la différence observée entre les deux réducteurs lors des cinétiques.

### 3. Etude mécanistique de la réactivité du système avec l'ascorbate de sodium

Dans un premier temps, nous nous proposons de suivre la réduction de la flavine par spectroscopie UV-visible en modifiant légèrement les conditions réactionnelles afin de pouvoir observer les bandes caractéristiques de la FMN (370 nm et 450 nm).

a) Suivi de la réduction de la flavine par spectroscopie UV-visible

Comme nous l'avons montré précédemment, la réduction de la FMN incorporée dans le PEI<sub>ref</sub> par 10 équivalents de NADH en condition anaérobie se traduit par une diminution de sa bande d'absorbance à 450 nm (Figure 109A). Dans ces conditions, la FMN est totalement réduite après une heure et peut facilement être réoxydée par simple exposition à l'oxygène en une vingtaine de minutes (Figure 109B).

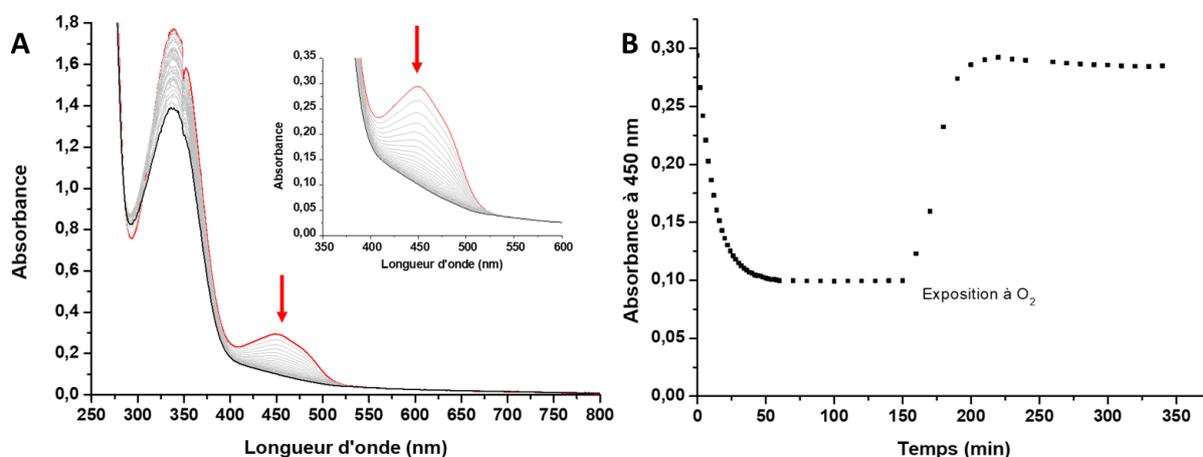


Figure 109 : A) Evolution du spectre UV-Visible d'une solution de FMN (25 µM) dans l'eau désoxygénée en présence de NADH (250 µM) et de PEI<sub>ref</sub> (2,5 mM) : (—) t = 0, (---) t<sub>final</sub> = 150 min. B) Suivi en fonction du temps de l'absorbance à 450 nm de la bande caractéristique de la FMN (25 µM) en présence de NADH (250 µM) et de PEI<sub>ref</sub> (2,5 mM) dans l'eau désoxygénée (Jusqu'à 150 min.) puis réoxydation par O<sub>2</sub> après réouverture à l'air.

En revanche, lorsque la réaction est effectuée avec l'ascorbate de sodium, on observe un spectre complètement différent. La bande d'absorbance à 450 nm ne subit aucune modification après l'ajout du réducteur et reste stable durant la totalité de la réaction. La Figure 110 montre également l'apparition d'une bande à 614 nm qui atteint son maximum après 10 h de réaction et décroît ensuite lentement. En parallèle, on observe également l'augmentation de la bande à 360 nm. Cette étude permet de mettre en évidence la formation d'une nouvelle espèce qui, d'après la littérature, semblerait être la flavine semiquinone. <sup>[132-134]</sup> Or, à l'heure actuelle, aucune étude par spectroscopie UV-visible n'a été réalisée sur des flavines semiquinones en dehors de leur squelette protéique. C'est pourquoi des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer la formation de ce radical.

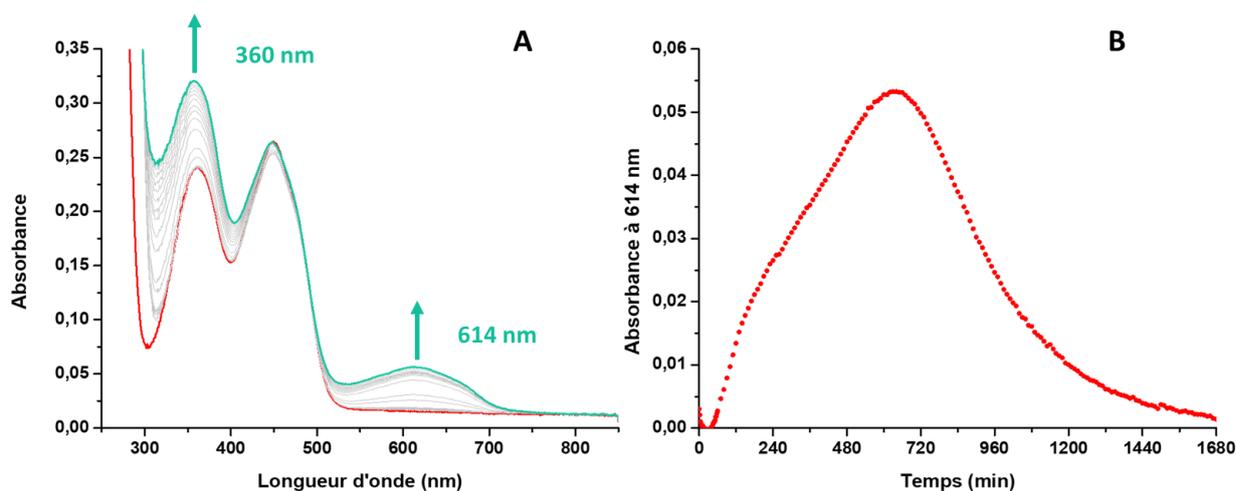


Figure 110 : A) Evolution du spectre UV-Visible d'une solution de FMN (25 μM) dans l'eau désoxygénée en présence d'Ascorbate de sodium (250 μM) et de PEI<sub>ref</sub> (2,5 mM) en solution tamponnée à pH = 7,0 (20 mM d'HEPES) : (—) t = 0, (---) t = 600 min. B) Suivi de l'absorbance à 614 nm en fonction du temps d'une solution de FMN (25 μM) dans l'eau désoxygénée en présence de PEI<sub>ref</sub> (2,5 mM) après ajout d'ascorbate de sodium (250 μM).

Lorsque la réaction est effectuée en absence de polymère, le spectre d'absorbance caractéristique de la FMN ne subit aucune modification après ajout de l'ascorbate de sodium (Figure 111B). Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, le polymère commercial permet l'oxydation du NADH par la FMN avec des cinétiques comparables à celle du polymère fonctionnalisé. Or, si le polymère commercial est utilisé avec l'ascorbate de sodium, on observe l'apparition de la bande à 614 nm, mais avec une intensité 10 fois moins importante qu'avec le polymère fonctionnalisé (Figure 111A). Ces résultats confirment de nouveau que le PEI<sub>com</sub>, chargé positivement, permet l'incorporation de la FMN et facilite sa réduction. Cependant, les groupements octyle et guanidinium semblent avoir davantage d'importance pour la stabilité de ce nouvel intermédiaire que pour l'oxydation du NADH.

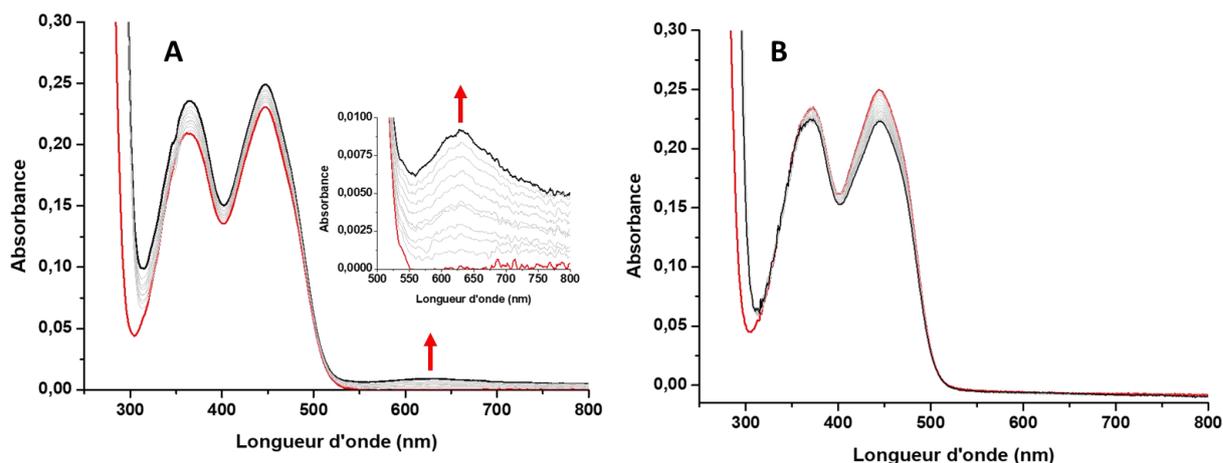


Figure 111 : A) Evolution du spectre UV-Visible d'une solution de FMN (25  $\mu\text{M}$ ) dans l'eau désoxygénée en présence d'Ascorbate de sodium (250  $\mu\text{M}$ ) et de PEI<sub>com</sub> (2,5 mM) : (—)  $t = 0$ , (---)  $t_{\text{final}} = 400$  min. B) Evolution du spectre UV-Visible d'une solution de FMN (25  $\mu\text{M}$ ) dans l'eau désoxygénée en présence d'Ascorbate de sodium (250  $\mu\text{M}$ ) et en absence de PEI : (—)  $t = 0$ , (---)  $t_{\text{final}} = 400$  min.

L'étape suivante a donc été d'étudier l'influence du pH sur la formation de cette intermédiaire. Effectivement, les formes anioniques et neutres de la flavine semiquinone peuvent être stabilisées dans les enzymes et présenter des spectres UV caractéristiques (Chapitre 1 : Introduction Bibliographique, Propriétés spectrales, Figure 6).

Le système PEI<sub>m</sub>-FMN-Asc en absence d'oxygène est donc étudié à différent pH, l'objectif étant de pouvoir observer les deux formes de la flavine semiquinone. On peut ainsi observer à pH = 5,5 (Figure 112A) une absence totale de la bande à 614 nm après l'ajout d'ascorbate de sodium, mais une forte augmentation de la bande à 360 nm. L'augmentation du pH jusqu'à 8,5 (Figure 112 - B, C et D) permet ensuite le passage d'une solution jaune à une solution verte, qui reflète la formation progressive de la bande à 614 nm, ainsi que la diminution de l'intensité de la bande à 360 nm. Ces résultats sont assez étonnants si on compare aux spectres UV-visible rapportés dans la littérature pour des flavines semiquinone stabilisées dans des enzymes.<sup>[134–137]</sup> En effet, dans les flavoprotéines, les bandes caractéristiques des flavines semiquinone neutres à 580 et 615 nm ne sont observées qu'à pH basique et en aucun cas à pH acide. Par ailleurs, il est important de noter que dans le système PEI<sub>ref</sub>-FMN, l'apparition des nouvelles bandes à 360 ou 614 nm n'est pas concomitante à la décroissance de la bande à 450 nm, correspondant à la FMN oxydée. Ces résultats incohérents, associés à l'absence dans la littérature d'autres études en solution aqueuse de ce type

d'intermédiaire, nous empêchent de pouvoir tirer une conclusion définitive sur la nature de l'espèce formée.

Comme décrit dans l'introduction (Propriétés spectrales), les flavines semiquinone possèdent une signature spectrales caractéristique en fluorescence, donc, afin de confirmer l'existence de cette espèce, des spectres de fluorescence, à la fois du système FMN-Asc et FMN-NADH en présence de polymère, ont été envisagés. Cependant, l'appareillage disponible pour réaliser l'étude par spectroscopie de fluorescence ne nous permet pas de travailler en condition anaérobie. et les études ont donc été réalisées en conditions aérobie.

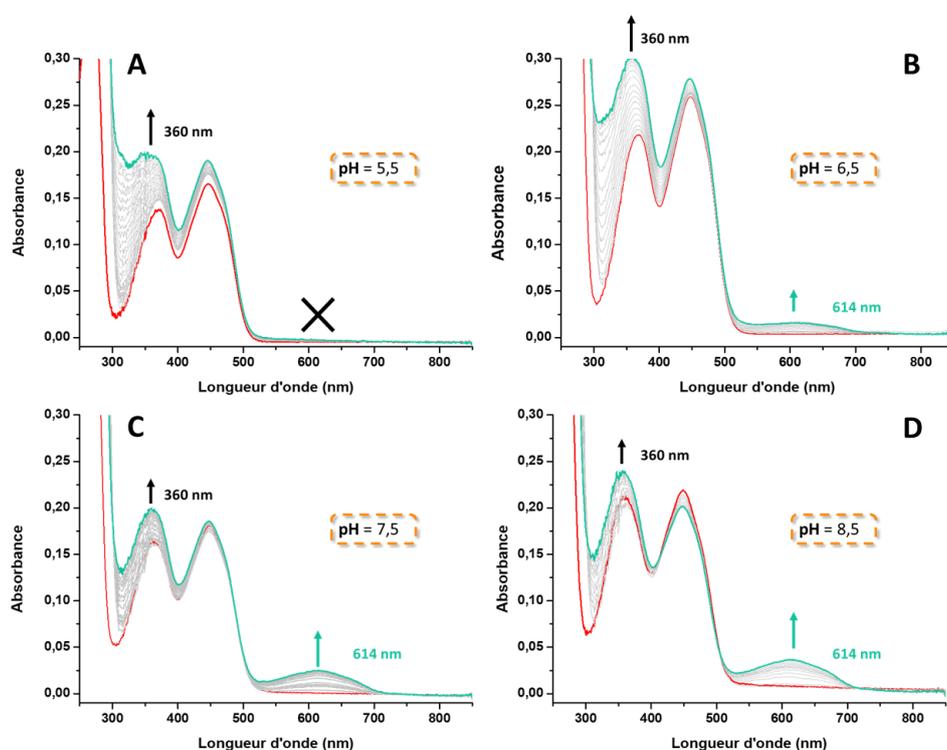


Figure 112 : Evolution du spectre UV-Visible d'une solution de FMN (25 µM) dans l'eau désoxygénée en présence d'Ascorbate de sodium (250 µM) et de PEI<sub>ref</sub> (2,5 mM) : A) en solution tamponnée à pH = 5,5 (MES (20 mM)) : (—) t = 0, (—) t = 300 min. B) en solution tamponnée à pH = 6,5 (MES (20 mM)) : (—) t = 0, (—) t = 700 min. C) en solution tamponnée à pH = 7,5 (HEPES (20 mM)) : (—) t = 0, (—) t = 700 min et D) en solution tamponnée à pH = 8,5 (CHES (20 mM)) : (—) t = 0, (—) t = 800 min

La Figure 113 montre qu'en présence d'oxygène le système PEI<sub>ref</sub>-FMN-Asc est capable de former cette nouvelle espèce, mais en quantité moins importante qu'en absence de dioxygène. La stabilité de l'espèce est également impactée par la présence du dioxygène avec une durée de vie deux fois moins importante. Cette expérience met en lumière une réactivité entre le dioxygène et

cet intermédiaire, mais avec une vitesse de réaction faible nous permettant d'observer cette espèce en spectroscopie UV-visible.

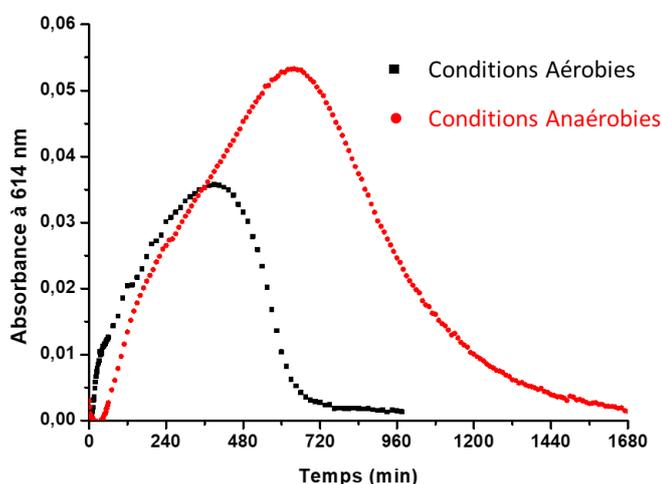


Figure 113 : Suivi de l'absorbance à 614 nm fonction du temps d'une solution de FMN (25 µM) en présence de PEI<sub>ref</sub> (2,5 mM) après ajout d'ascorbate de sodium (250 µM) dans l'eau désoxygénée (●) ou dans l'eau oxygénée (■).

Pour essayer d'améliorer la quantités d'espèces formée en présence d'oxygène, des études sur la concentration en ascorbate et en polymère ont été réalisées. Les résultats présentés dans la Figure 114A montrent que l'addition de 25 équivalents d'ascorbate de sodium par rapport à la flavine sont nécessaire pour atteindre le maximum d'absorption à 614 nm et permettent également d'obtenir une absorbance supérieure à celle obtenue en conditions anaérobies avec 10 équivalents d'ascorbate de sodium. L'ajout d'une plus grande quantité d'agent réducteur permet seulement d'améliorer légèrement la cinétique de formation de l'espèce. Ensuite, concernant les proportions de monomère par rapport à la FMN, l'ajout d'une quantité croissante de polymère (jusqu'à 2,5 mM, 100 équivalents) permet d'améliorer la quantité de chromophore formé (Figure 114B). Cependant, au-delà de cette concentration, le système précipite et devient impossible à étudier par spectroscopie UV-visible.

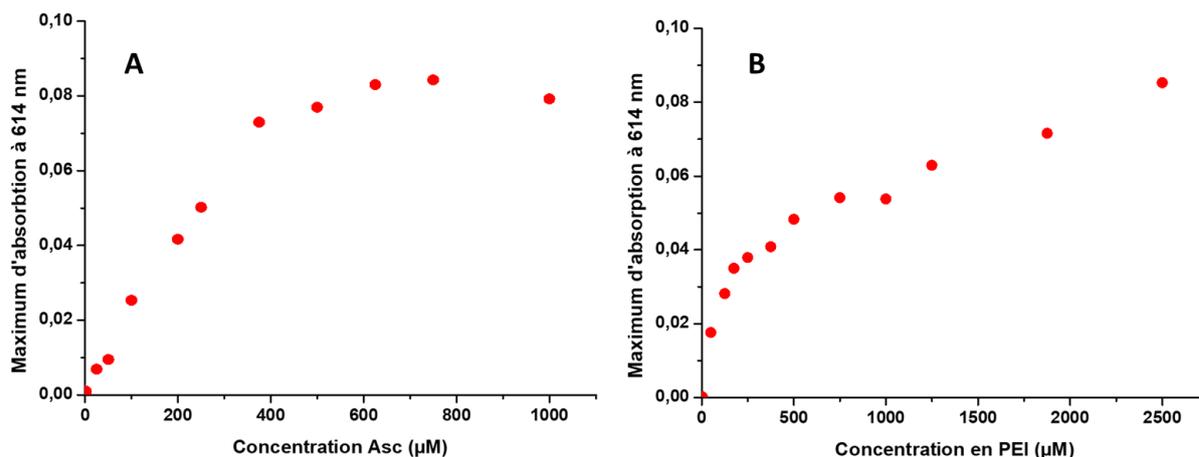


Figure 114 : A) Evolution de l'absorbance à 614 nm lors de l'addition de concentrations croissantes en Ascorbate de sodium (0-1000 µM) à une solution aqueuse de FMN (25 µM) et de PEI<sub>ref</sub> (2,5 mM). B) Evolution de l'absorbance à 614 nm lors de l'ajout de concentration croissantes en PEI<sub>ref</sub> (0-2500 µM) à une solution aqueuse de FMN (25 µM) et d'ascorbate de sodium (625 µM).

Enfin, cinq polymères portant des proportions différentes en groupements guanidinium et octyle ont été utilisés pour étudier leur influence sur la réduction de la flavine par l'ascorbate de sodium. Dans le tableau ci-dessous sont décrits les différents polymères utilisés pour cette étude.

Tableau 20 : Noms et structures des polymères quantifiés par RMN

Polymères	Nombre d'équivalent mesuré par RMN guani/octyle/acide vs [mono]
PEI <sub>com</sub>	0/0/0
PEI <sub>mg</sub> 12	0,09/0/0
PEI <sub>mgo</sub> 13	0,29/0,19/0
PEI <sub>mgo</sub> 4	0,17/0,37/0
PEI <sub>ref</sub>	0,17/0,17/0
PEI <sub>macgo</sub> 38	0,29/0,33/0,06

Le PEI<sub>mg</sub> 12 et PEI<sub>com</sub>, ne possédant pas de groupements octyle dans leur structure, sont les polymères les moins favorables (Figure 115). Les autres polymères possèdent quant à eux des groupements octyle ainsi que des groupements guanidinium en différentes proportions (PEI<sub>mgo</sub> 13, PEI<sub>mgo</sub> 4, et PEI<sub>ref</sub>) et également des groupements acides carboxylique (PEI<sub>macgo</sub> 38). La meilleure stabilisation de l'intermédiaire est obtenue avec le polymère de référence, puis elle diminue légèrement quand les proportions en octyle ou en guanidinium sont trop importantes. Il faut noter

que la faible activité observée avec les polymères sans octyle met en avant l'importance de ce groupement et donc de l'environnement hydrophobe qu'il apporte pour stabiliser l'espèce formée. Au final, pour les quatre polymères bi ou trifonctionnalisés, la formation de l'espèce absorbant à 614 nm est relativement similaire quelles que soient les proportions en octyle et en guanidinium (Figure 115).

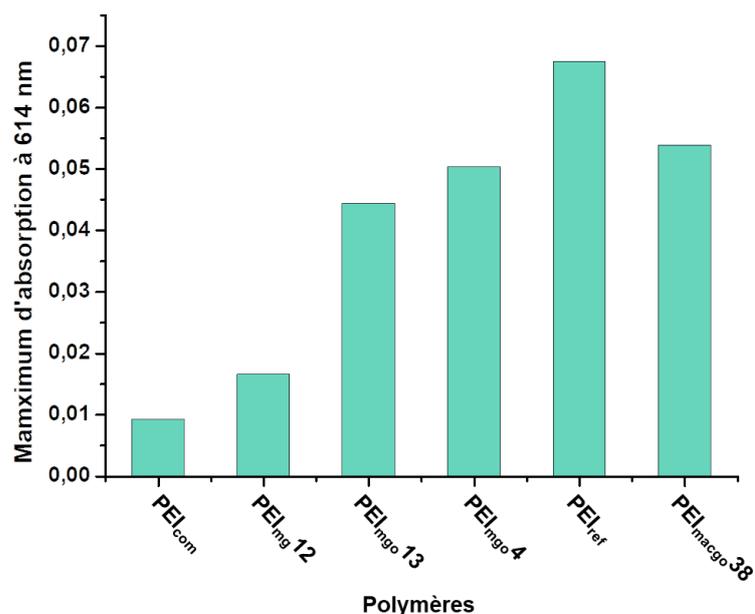
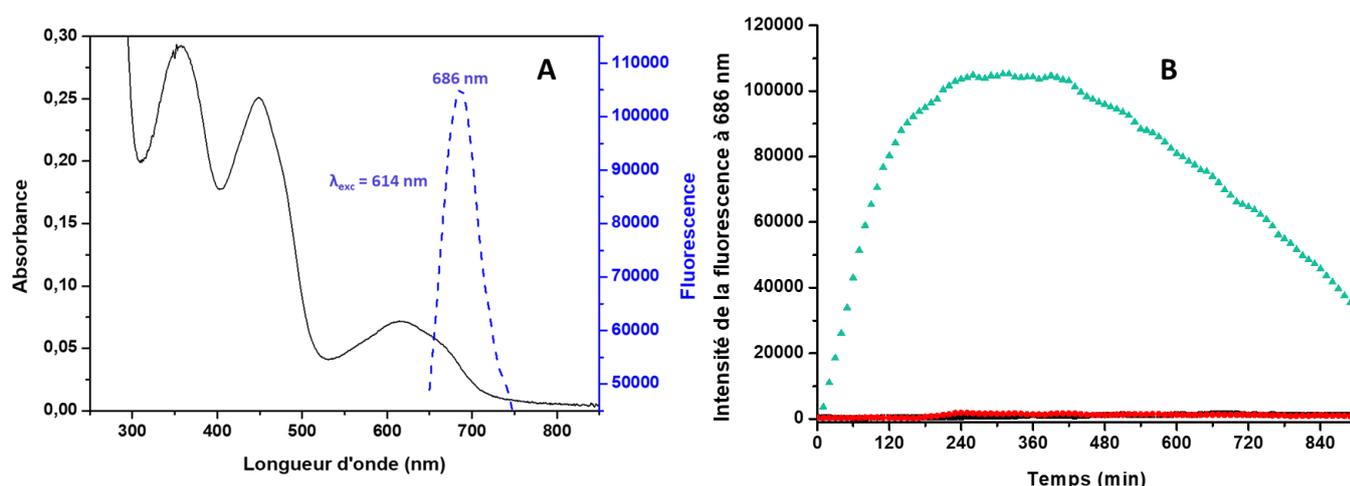


Figure 115 : Maximum d'absorbance mesuré à 614 nm d'une solution de FMN (25  $\mu$ M), d'ascorbate de sodium (625  $\mu$ M) et avec différents polymères (2,5 mM).

Suite à ces études en spectroscopie d'absorption électronique, la spectroscopie de fluorescence a été envisagée pour étudier la réduction de la FMN par l'ascorbate. Cependant, en raison d'études préliminaires démontrant le quenching de la fluorescence de la FMN après l'ajout de 25 équivalents de monomère de PEI<sub>ref</sub> par rapport à la flavine, une modification des conditions d'analyses était nécessaire. De façon à obtenir une bonne activité sans quencher complètement la fluorescence du cofacteur flavinique, 20 équivalents de monomère de PEI<sub>ref</sub> par rapport à la FMN seront utilisés pour entreprendre l'étude.

**b) Etude par spectroscopie de fluorescence**

Suite à l'observation, lors de la réaction d'une solution de FMN (25  $\mu\text{M}$ ) avec l'ascorbate de sodium (625  $\mu\text{M}$ ) en présence de PEI<sub>ref</sub> (2,5 mM) dans l'eau et en présence d'oxygène, d'une bande d'absorbance à 614 nm qui pourrait correspondre à la formation d'une espèce radicalaire de type semiquinone, nous avons irradié cet échantillon à cette même longueur d'onde, de façon à étudier ses propriétés de fluorescence. La Figure 116A montre l'apparition d'une bande d'émission à 686 nm, qui est comparable à celle des flavines semiquinones neutres observées pour les flavoenzymes à pH légèrement basique. Il faut noter que les réactions de contrôles en absence de polymères, ou en remplaçant l'ascorbate de sodium par du NADH, ne conduisent pas à la formation de cette espèce (Figure 116B).



**Figure 116 :** A) Spectre UV-visible d'une solution de FMN (25  $\mu\text{M}$ ) en présence de PEI<sub>ref</sub> (2,5 mM) et d'ascorbate de sodium (625  $\mu\text{M}$ ) dans l'eau (—) et spectre de fluorescence d'une solution de FMN (100  $\mu\text{M}$ ) en présence de PEI<sub>ref</sub> (2 mM) et d'ascorbate de sodium (1 mM), longueur d'excitation = 614 nm (---). B) Variation en fonction du temps de l'intensité de fluorescence à 686 nm d'une solution de FMN (100  $\mu\text{M}$ ) en présence de PEI<sub>ref</sub> (2 mM) et d'ascorbate de sodium (1 mM) ( $\blacktriangle$ ) ou de NADH (1 mM) ( $\bullet$ ); sans PEI<sub>ref</sub> ( $\blacksquare$ ), dans l'eau, après excitation à 614 nm.

Les études par spectroscopie UV-visible et de fluorescence suggèrent donc fortement la formation de la flavine semiquinone neutre grâce à la réduction monoélectronique de la FMN par l'ascorbate de sodium en présence de polymère. Toutefois, une étude RPE a également été réalisée afin de confirmer la formation du radical flavinique.

c) Etude par spectroscopie RPE

La réduction de la flavine en présence de polymère a donc été analysée par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE). Pour cela, le spectre RPE d'une solution de FMN (1 mM) en présence de PEI<sub>ref</sub> (5 mM) et d'ascorbate de sodium (10 mM) a été enregistré après 10 h d'agitation dans l'eau désoxygénée, ce qui correspond au temps pour atteindre la concentration maximale de la nouvelle espèce absorbant à 614 nm.

Le spectre RPE obtenu à partir de la solution de FMN en présence de polymère et d'ascorbate de sodium, présente un singulet centré à  $g = 2,003$  d'intensité très faible, qui pourrait correspondre au signal du radical FMN. Cependant, la faible intensité du signal nous empêche de conclure avec certitude sur la formation de la semiquinone.

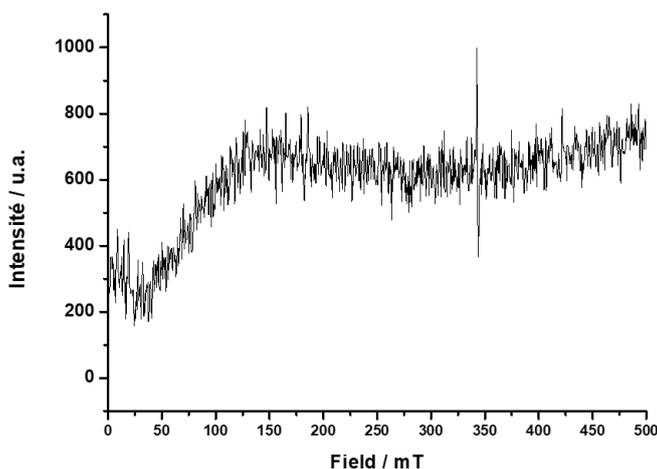


Figure 117 : Spectre RPE après 10 h d'agitation d'une solution de FMN (1 mM) en présence de PEI<sub>ref</sub> (5 mM) et d'ascorbate de sodium (10 mM) dans l'eau désoxygénée.

L'augmentation de la concentration en FMN à 1 mM pour les analyses RPE provoque l'apparition d'un léger précipité en cours de réaction. La faible intensité du signal obtenue lors de l'analyse RPE de la solution nous a alors poussé à réaliser l'analyse RPE du précipité obtenu. Ainsi, l'analyse du solide obtenu en fin de réaction, après évaporation à sec, a permis de mettre en évidence un signal RPE beaucoup plus intense centré à  $g = 2,00358$  (Figure 118 A) qui pourrait correspondre à la formation du radical flavinique à l'aide du système PEIm-ascorbate de sodium et donc confirmer les résultats obtenus en spectroscopie UV-visible et en fluorescence. De plus, ce résultat corrèle avec les travaux de l'équipe de Schleicher, qui a caractérisé les radicaux FMN<sup>•-</sup> et FMNH<sup>•</sup> en solution

aqueuse en piégeant ces radicaux dans une matrice d'agarose.<sup>[138]</sup> En parallèle, différents contrôles ont été réalisés afin de corréliser ce résultat avec ceux obtenus en absorbance et en fluorescence. Lorsque la FMN est seule en solution, l'ajout d'ascorbate de sodium ne permet pas sa réduction, ce qui corrèle avec les études par spectroscopies UV-visible et de fluorescence. Cependant, la réaction effectuée avec le NADH génère aussi un signal RPE très similaire à celui obtenu avec l'ascorbate (Figure 118B).

Ces résultats sont contradictoires à ceux obtenus à la fois en spectroscopie UV-visible et en fluorescence, mais peuvent cependant être rationalisés. En effet, contrairement aux analyses RPE réalisées directement sur le mélange réactionnel, dont les échantillons ne sont jamais exposés au dioxygène, les analyses RPE réalisées sur les solides nécessitent un prélèvement au contact de l'air. Il se peut donc que la FMN réduite par NADH réagisse avec le dioxygène pour former un intermédiaire radicalaire. Ce contrôle ne nous permet donc pas de conclure définitivement sur la formation de la flavine semiquinone, car il semble mettre en évidence que l'oxygène moléculaire soit à l'origine du signal observé en RPE avec NADH. Ce phénomène pouvant également être à l'origine du signal observé avec l'ascorbate, ces résultats obtenus en RPE ne permettent pas de conclure sur la formation de l'intermédiaire semiquinone. Nous devons donc, dès que possible, réaliser ce prélèvement en boîte à gants de façon à démontrer si en absence d'oxygène, le radical semiquinone se forme bien avec l'ascorbate et ne se forme pas avec NADH.

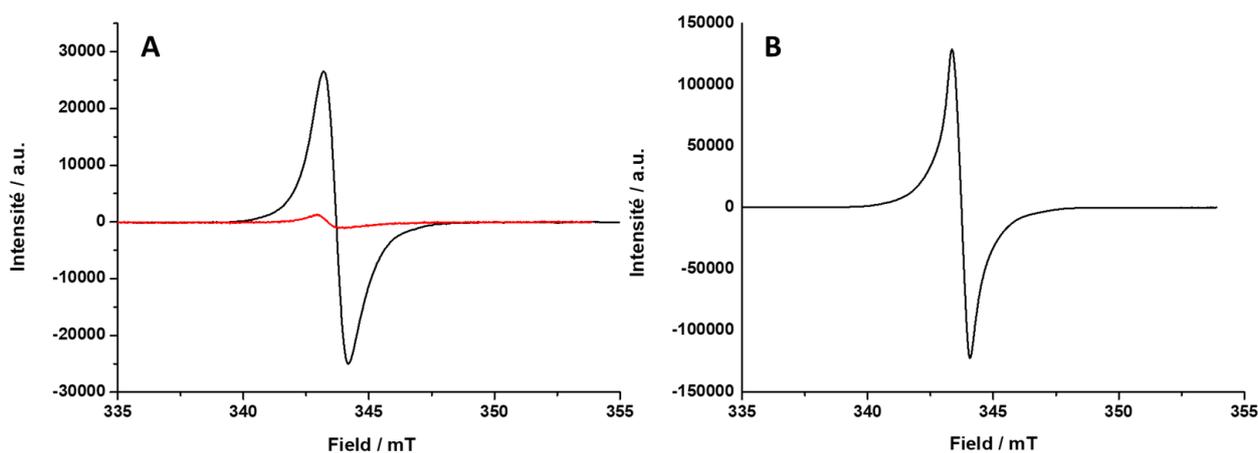


Figure 118 : A) Spectre RPE du solide après 10 h d'agitation d'une solution de FMN (1 mM) en présence d'ascorbate de sodium (10 mM) de PEI<sub>ref</sub> (5 mM) (—) et en absence de PEI<sub>ref</sub> (—) dans l'eau désoxygénée. B) Spectre RPE du solide après 10 h d'agitation d'une solution de FMN (1 mM) en présence de NADH (10 mM) de PEI<sub>ref</sub> (5 mM) dans l'eau désoxygénée

En conclusion, l'objectif initial de remplacer le NADH par de l'ascorbate de sodium afin de réaliser des oxydations en quantités stœchiométriques n'a pas été atteint en raison de la probable réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'excès d'ascorbate de sodium. Cependant, à de plus faibles concentrations, l'ascorbate de sodium est capable de réduire la FMN enfouie au sein du polymère et permet de réaliser des réactions d'oxydation avec des rendements similaires à ceux obtenus avec NADH.

De plus, les études de spectroscopie UV-visible et de fluorescence ont montré la formation et la stabilisation d'un nouvel intermédiaire au sein de polymères fonctionnalisés faisant du système associant la FMN, le polymère et l'ascorbate de sodium comme réducteur le premier système, en dehors des flavoenzymes, à présenter des spectres UV-visible et de fluorescence caractéristiques d'une flavine sous forme semiquinone. Cependant, les études par spectroscopie RPE ne sont pas suffisamment abouties pour pouvoir confirmer ce résultat. Une nouvelle méthodologie est donc requise pour réaliser l'analyse RPE du solide sans exposition à l'oxygène moléculaire, afin de clôturer cette étude sur le radical flavinique.

Au vu des résultats obtenus avec l'ascorbate et la formation d'un radical relativement stable au sein du polymère, nos collaborateurs ont entrepris de réaliser des réactions radicalaires en conditions anaérobies. Les sels de diaryliodonium ont ainsi été choisis comme substrats en raison de leur capacité à promouvoir la formation d'un radical aryle via un transfert monoélectronique. Au cours de ces études, notre rôle a principalement été de piéger le radical phényle de façon à démontrer sa formation par spectroscopie RPE.

#### 4. Chimie radicalaire

Après une série d'expériences exploratoires et de phases d'optimisation, le système biomimétique composé de PEI<sub>ref</sub> (50 mM) de FMN (5 mM) et d'ascorbate de sodium (100 mM) s'est avéré capable de catalyser la formation de liaison C-C entre un pyrrole et un sel d'iodonium en quantité stœchiométrique par rapport à l'ascorbate de sodium avec un rendement de 30% (Figure 119). Il a cependant été démontré par nos collaborateurs que le caractère électrophile du sel d'iodonium pouvait également conduire à une réactivité de type substitution nucléophile aromatique avec l'excès de pyrrole utilisé.

#### Chapitre 4 : Evolution des conditions catalytiques

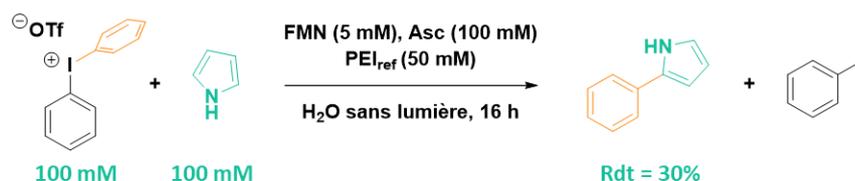


Figure 119 : Réaction entre le pyrrole (100 mM) et un sel d'iodonium Ph<sub>2</sub>IPF<sub>6</sub> (100 mM) catalysée par l'enzyme artificielle constituée de FMN (5 mM) et de PEI<sub>ref</sub> (50 mM) en présence d'ascorbate (100 mM), dans l'eau en absence d'oxygène.

Pour déterminer quel type de réactivité était réellement mise en jeu dans les conditions réactionnelles utilisées, nous avons entrepris de piéger le radical phényle et de prouver sa formation par spectroscopie RPE. Le radical phényle ayant un temps de demi-vie court, il a été envisagé de le piéger à l'aide d'une molécule possédant une fonction nitrone. Pour ce faire, le polymère, la FMN et l'ascorbate de sodium ont été mis en présence du diphenyle-iodonium avec la N-tert-butyle- $\alpha$ -phényl nitrone (PBN) en tant que piégeur de radical (Figure 120).

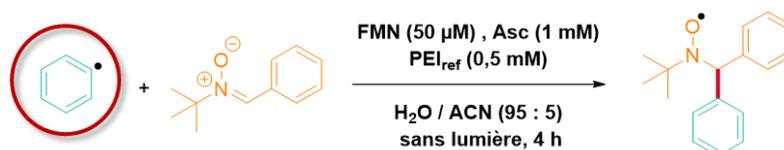


Figure 120 : Piégeage du radical phényle par le PBN (1 mM) lors de la réaction entre le pyrrole (1 mM) et un sel d'iodonium Ph<sub>2</sub>IPF<sub>6</sub> (1 mM) catalysée par l'enzyme artificielle (FMN (50  $\mu$ M) PEI<sub>ref</sub> (0,5 mM)) en présence d'ascorbate (1 mM), dans l'eau en absence d'oxygène.

Le triplet de doublet centré en  $g = 2,0059$  représenté sur la Figure 121A est représentatif du signal de l'adduit nitroxyde obtenu lors de la réaction entre le PBN et le radical phényle. En parallèle, des réactions de contrôle en absence de différents constituants ont également été réalisées. En supprimant l'ascorbate de sodium ou le sel d'iodonium (Figure 121 – C et D), aucun signal n'est observé. Par contre, concernant le contrôle en absence du système PEIm-FMN, on observe le signal caractéristique de l'adduit nitroxyde, suggérant que l'ascorbate seul est capable de réduire légèrement le sel d'iodonium et de former ainsi le radical phényle en plus faibles quantités.

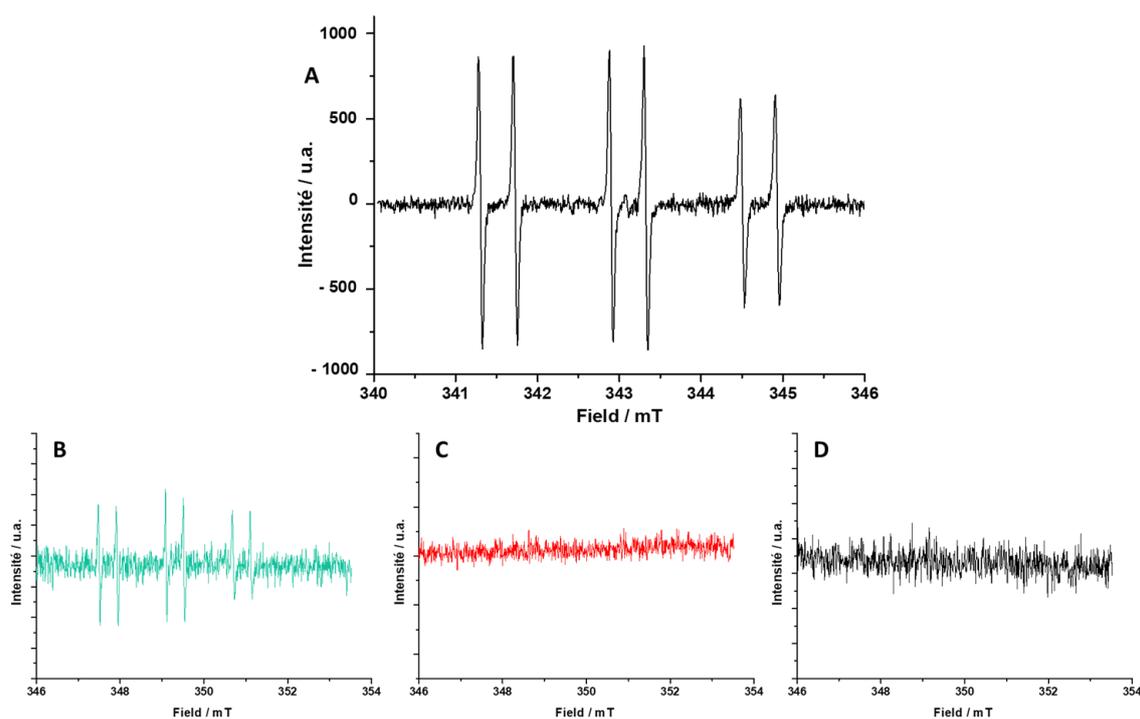


Figure 121 : A) Spectre RPE d'une solution de FMN (50  $\mu$ M) en présence de PEI<sub>ref</sub> (0,5 mM), d'ascorbate de sodium (1 mM), de Ph<sub>2</sub>IPF<sub>6</sub> (1 mM) et de PBN (1 mM). B) En absence de PEI/FMN, C) en absence d'ascorbate de sodium et D) en absence de Ph<sub>2</sub>IPF<sub>6</sub>.

L'étude RPE a ainsi permis de prouver la formation de l'intermédiaire radicalaire, démontrant également le mécanisme supposé précédemment. Malgré la compétition avec la substitution nucléophile aromatique, le système **PEIm-FMN-Asc** est donc capable de réaliser un transfert monoélectronique vers un substrat et d'engendrer des réactions radicalaires.

## 5. Conclusion

Pour résumer, le remplacement de NADH par l'ascorbate de sodium en tant que réducteur pour l'enzyme artificielle polymère/FMN s'est avéré être un bon choix qui a permis de réaliser des réactions d'oxydation de divers substrats organiques (cétones et thioéthers) par le dioxygène avec de bons rendements. Cependant, concernant son utilisation en quantité stœchiométrique, voir sur-stœchiométrique, un problème majeur a été mis en évidence dans les différents paragraphes : la réduction du peroxyde d'hydrogène par l'excès de l'ascorbate de sodium, qui inhibe fortement l'activité du système. Par ailleurs, la stabilisation de l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine est le point clé pour résoudre le problème de formation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solution. Pour cela, deux possibilités s'offrent

à nous, soit effectuer des modifications sur le polymère pour créer des « sites actifs » stabilisant l'intermédiaire, soit modifier la flavine en position N<sub>5</sub> ou N<sub>3</sub> toujours dans l'optique de stabiliser l'espèce active et de limiter la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

D'un point de vue mécanistique, ce nouveau système s'est montré particulièrement efficace pour former, semble-t-il, une flavine semiquinone (neutre ou anionique) stabilisée au sein des poches hydrophobes du polymère. Il semblerait donc que le polymère fonctionnalisé limite la diffusion des espèces en solution, ce qui pourrait réduire considérablement la réaction de dismutation entre deux radicaux flaviniques et favoriser l'accumulation du radical flavine semiquinone.<sup>[138]</sup> Ces espèces ont pu être caractérisées pour la première fois par spectroscopie UV-visible et de fluorescence en dehors des enzymes. Cependant, il reste à optimiser les conditions pour confirmer la nature du radical flavine par spectroscopie RPE.

Enfin, le système a prouvé qu'il était capable d'effectuer des transferts monoélectroniques vers des substrats organiques, initiant ainsi des réactions radicalaires dans l'eau et à température ambiante, sans utilisation en quantité stœchiométrique de composés toxiques comme l'étain, ou de températures élevées comme c'est encore le cas dans de nombreux procédés en chimie radicalaire.<sup>[139]</sup>

En conclusion, la première option consistant à remplacer le NADH par un réducteur moins coûteux afin de réaliser des réactions en quantité stœchiométrique n'a pas abouti aux résultats escomptés. L'option de régénérer le NADH à l'aide de différentes méthodes a donc été envisagée.

## II. Régénération de NADH en cours de catalyse

Les systèmes biocatalytiques utilisent souvent des cofacteurs tels que NADH, et la viabilité économique du système dépend majoritairement de l'efficacité de la régénération de ce cofacteur. Le NAD(H) peut être obtenu à partir de procédés de fermentation bactérienne<sup>[140]</sup> ou par isolement à partir de levure<sup>[141]</sup>. Ces deux méthodes reposent sur un protocole lourd à mettre en œuvre expliquant le coût important de NADH.

Il existe six grandes méthodes pour régénérer le NADH :

- Enzymatique
- Biologique
- Electrochimique
- Electro-enzymatique
- Chimique
- Photochimique

Ici nous nous intéresserons uniquement aux méthodes enzymatiques et chimiques.

Bien que moins utilisée, l'approche chimique pour la régénération du NADH a fait l'objet de quelques travaux ces dernières années. Historiquement, la réduction de  $\text{NAD}^+$  par  $\text{NaS}_2\text{O}_4$ ,<sup>[142]</sup> représente l'une des toutes premières méthodes mise au point. Cependant, cette technique présente l'inconvénient d'être très peu sélective, bien qu'elle soit bon marché. Plus récemment, l'utilisation de catalyseurs métalliques (complexe de Ruthénium ou Iridium) pour la réduction de  $\text{NAD}^+$  en NADH par le dihydrogène, ou l'utilisation du formiate de sodium, ont connu un grand engouement. Ces catalyseurs présentent une grande sélectivité pour  $\text{NAD}^+$  et sont compatibles avec les conditions réactionnelles utilisées par le système polymère/ FMN/ NADH en milieu aqueux à pH 8,5 et à température ambiante.

### 1. Utilisation d'un complexe d'iridium

Nous nous sommes donc tout d'abord orientés vers un complexe d'iridium utilisant le formiate de sodium comme donneur sacrificiel d'hydrures (Figure 122).<sup>[143]</sup>

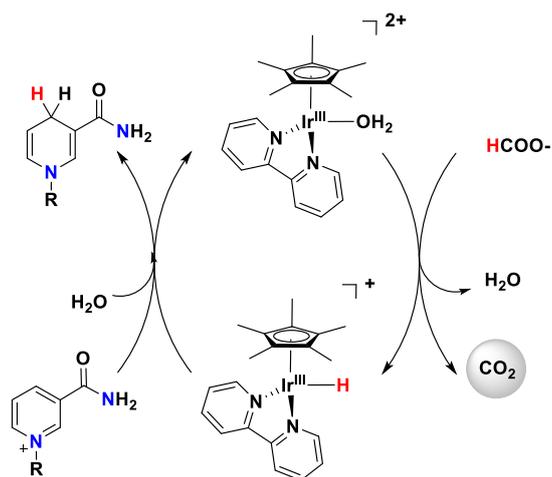


Figure 122 : Mécanisme proposé pour la réduction du NAD<sup>+</sup> par un complexe d'iridium utilisant du formiate.

a) Synthèse du complexe

Le complexe [Cp\*Ir(H-bpy)Cl]Cl est préparé, comme décrit dans la littérature, à partir de [Cp\*IrCl<sub>2</sub>] (12,5 mM) dans le méthanol en présence de deux équivalents de pyridine (25 mM).<sup>[144]</sup> Le mélange est agité sous atmosphère inerte durant 16 h. La poudre obtenue en fin de réaction est solubilisée dans le méthanol puis recristallisée par diffusion d'éther avec un rendement isolé de 91%. Le complexe étant déjà décrit dans la littérature, une analyse par spectroscopie RMN a suffi à confirmer la structure du complexe (Figure 123).<sup>[144]</sup>

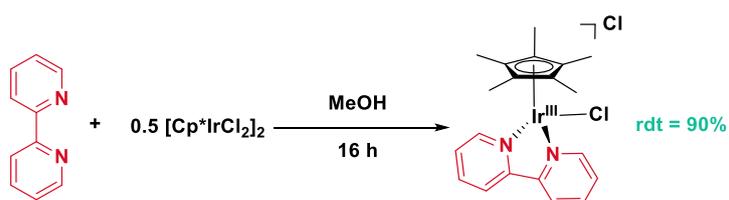


Figure 123 : Synthèse du complexe d'iridium [Cp\*Ir(H-bpy)Cl]Cl.

**b) Etude de la réduction de NAD<sup>+</sup> par spectroscopie UV-visible**

Le complexe [Cp\*Ir(H-bpy)Cl]Cl utilisé dans cette étude sera appelé [Ir] ou simplement complexe d'iridium. Dans un premier temps, nous avons suivi la réduction de NAD<sup>+</sup> (500 μM) par spectroscopie UV-visible. Cela en présence de différentes concentrations en complexe d'iridium (1-50 μM) pour une quantité donnée de formiate de sodium (50 mM) dans l'eau afin d'observer la capacité de ce complexe à catalyser la réduction du NAD<sup>+</sup> en NADH.

La mesure de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps révèle que le complexe d'iridium réduit efficacement NAD<sup>+</sup> en NADH en présence de formiate de sodium (Figure 124A). De plus, les mesures de vitesse initiale nous indiquent que l'activité du complexe d'iridium est d'autant plus grande que la concentration en [Ir] est élevée, avec une vitesse initiale en présence de [Ir] (50 μM) 20 fois supérieure à celle mesurée pour [Ir] (1 μM). Dans ces conditions, l'ajout de polymère diminue la vitesse de réduction catalysée par le complexe [Ir] d'un facteur 5 (Figure 124B), mais l'activité du complexe reste suffisante en présence du polymère pour réduire NAD<sup>+</sup> en NADH dans un temps similaire à celui nécessaire pour l'oxydation du NADH par le système PEIm-FMN (10 h pour oxyder 200 équivalents de NADH par rapport à la FMN).

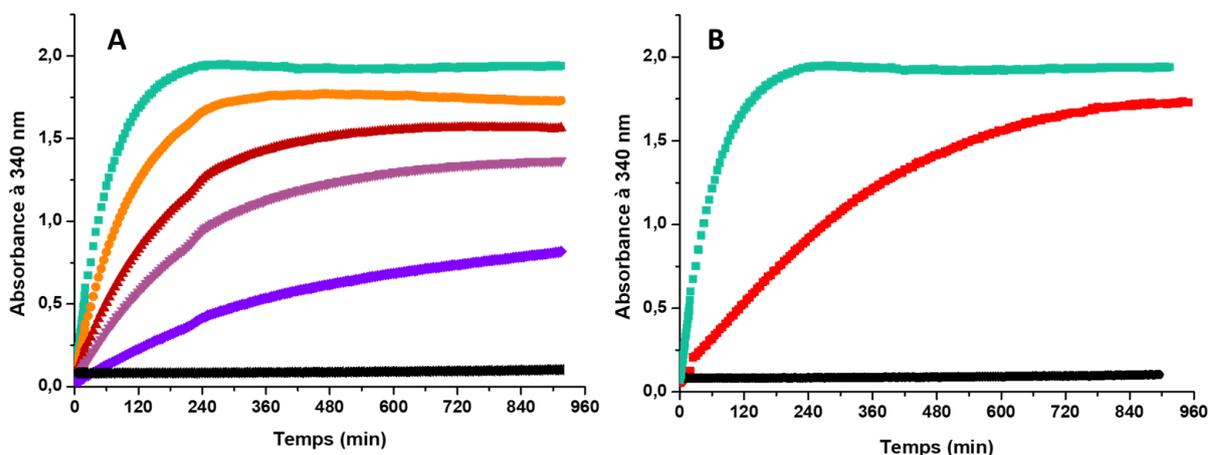


Figure 124 : Evolution de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps d'une solution aqueuse de NAD<sup>+</sup> (500 μM) : A) en présence de HCOONa (50 mM) et du complexe d'iridium (50 μM) (■), (25 μM) (●), (10 μM) (▲), (5 μM) (▼), (1 μM) (◆) et (0 μM) (■). B) Evolution de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps d'une solution aqueuse de NAD<sup>+</sup> (500 μM), en présence de HCOONa (50 mM), du complexe d'iridium (50 μM) (■) et de PEI<sub>ref</sub> (2,5 mM) (●), sans complexe d'iridium (●).

c) Catalyse d'oxydation en présence de l'enzyme artificielle et du complexe d'iridium

A la suite de ces premiers résultats, des réactions d'oxydation ont été conduites en présence du complexe d'iridium pour régénérer le NADH. Comme nous pouvions le présager au vu des résultats obtenus par spectroscopie UV-visible, l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en présence d'une quantité catalytique de complexe d'iridium (50  $\mu$ M), ainsi qu'un large excès de formiate de sodium (1 M), conduit en présence de l'enzyme artificielle (FMN 5  $\mu$ M, PEI<sub>ref</sub> 5 mM) et de 1 mM de NADH à la lactone correspondante avec une conversion de 50 % (Figure 125). Il faut noter cependant que le temps de réaction a été allongé à 72 h afin de permettre au système d'être le plus performant possible. Il semblerait donc que le complexe d'iridium régénère 4 fois le NADH au cours de la réaction.

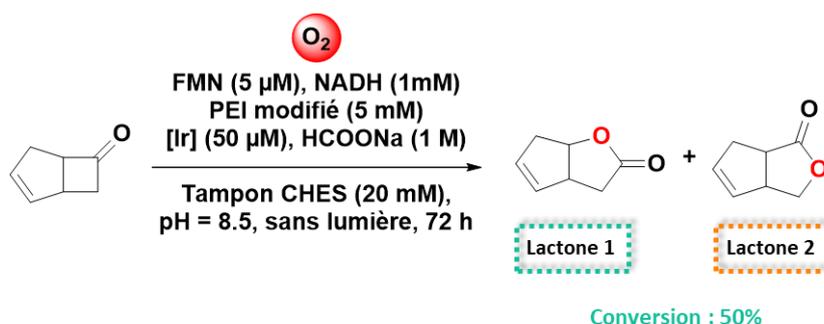


Figure 125 : Oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en présence de l'enzyme artificielle (FMN (5  $\mu$ M), PEI<sub>ref</sub> (5 mM)) et de NADH (1 mM), de complexe d'iridium (50  $\mu$ M) et de HCOONa (1 M), dans une solution tamponnée à pH = 8,5 (CHES 20 mM) à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Différentes réactions de contrôle ont ensuite été réalisées en supprimant les constituants du système les uns après les autres (Figure 126). La réaction réalisée sans le complexe d'iridium permet, comme attendu, de retrouver le rendement initial de 70 % de lactone 1 et 2 par rapport à la quantité de NADH introduit (soit une conversion de 7% de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one). En revanche, de manière surprenante, les expériences de contrôle sans NADH ou sans FMN conduisent à des conversions de 30 et 25 % respectivement. Enfin, une conversion de 70 % est obtenue lorsque la réaction est effectuée en absence de polymère.

## Chapitre 4 : Evolution des conditions catalytiques

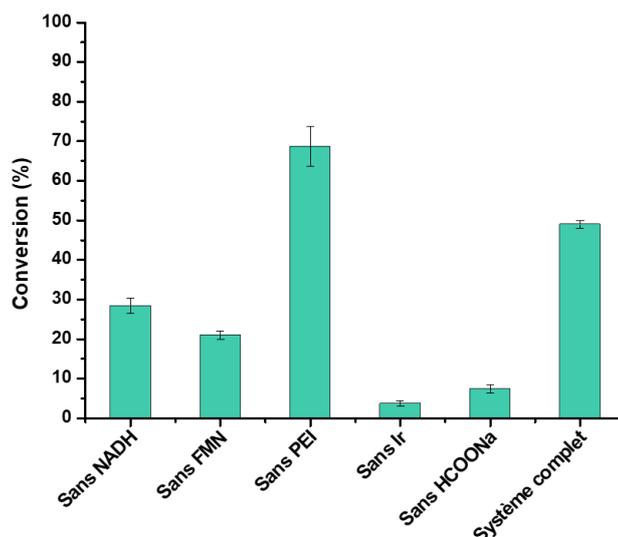


Figure 126 : Conversion en lactone 1 et 2 de de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) avec l'enzyme artificielle, FMN (5  $\mu$ M), PEI<sub>ref</sub> (5 mM) en présence de NADH (1 mM), de complexe d'iridium (50  $\mu$ M) et de HCOONa (1 M), dans une solution tamponnée à pH = 8,5 (CHES 20 mM) à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Dans le but de comprendre cette série de résultats, d'autres réactions de contrôle ont été entreprises, cette fois-ci en supprimant à la fois NADH, FMN et PEI<sub>ref</sub> (Tableau 21).

Tableau 21 : Réaction de contrôle pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one en présence de complexe d'iridium dans une solution tamponnée à pH = 8,5 (CHES 20 mM) à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Conditions <sup>a</sup>	Conversion (%)
Complexe d'iridium	0
Complexe d'iridium + HCOONa	55 $\pm$ 4
Complexe d'iridium + HCOONa + PEI <sub>ref</sub>	22 $\pm$ 2

<sup>a</sup> condition : bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM), complexe d'iridium (50  $\mu$ M) et HCOONa (1 M)

Le Tableau 21 nous indique que la réaction réalisée uniquement en présence du complexe d'iridium n'engendre pas de réactivité. En revanche, l'ajout de formiate de sodium à une solution contenant le complexe d'iridium permet d'obtenir une conversion de 55% en lactone 1 et 2. L'ajout du polymère au milieu réactionnel diminue de moitié l'activité du complexe avec une conversion de 22%. La diminution du rendement observée en présence de polymère modifié peut être due à la présence des amines qui peuvent piéger l'hydrure du complexe d'iridium, diminuant ainsi son efficacité pour activer le dioxygène.

Il semblerait donc que le complexe d'iridium en présence de formiate de sodium soit capable d'activer le dioxygène suivant le cycle décrit Figure 127 et ainsi de générer du peroxyde d'hydrogène permettant d'oxyder la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one. Ce phénomène a déjà été observé dans la littérature,<sup>[145-147]</sup> et nous avons également pu le mettre en évidence en mesurant la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solution.

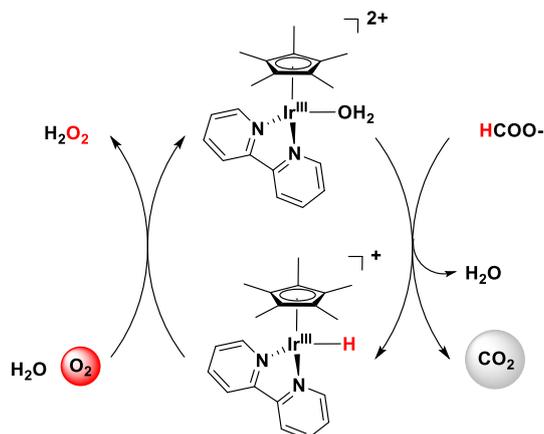


Figure 127 : Mécanisme proposé pour l'activation du dioxygène par un complexe d'iridium.

Suite à cette observation, nous avons abandonné l'utilisation de complexe d'iridium et nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'enzyme naturelle pour régénérer le NADH. Ce choix semble d'ailleurs plus approprié au développement d'un système catalytique éco-compatible impliquant des enzymes artificielles et des enzymes naturelles.

## 2. Utilisation de l'alcool déshydrogénase (ADH)

La seconde méthode envisagée pour régénérer le NADH consommé par l'enzyme artificielle, est l'utilisation d'une enzyme couplée à un substrat sacrificiel (Figure 128). Deux enzymes ont alors été sélectionnées : la formiate déshydrogénase de *candida biodinii* (FDH) et l'alcool déshydrogénase de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH).

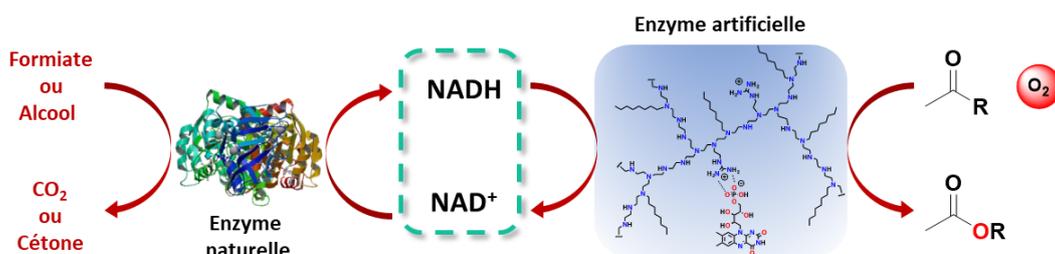


Figure 128 : Représentation schématique de l'oxydation d'un substrat à l'aide de l'enzyme artificielle et régénération du NADH avec une enzyme naturelle.

a) Choix du substrat pour l'ADH et réaction d'oxydation

L'utilisation d'une ADH est particulièrement attrayante, puisqu'elle permettrait non seulement de régénérer NADH, mais aussi d'envisager de réaliser une réaction tandem. En effet, pour régénérer NADH, l'ADH oxyde un alcool en cétone qui pourrait à son tour être utilisée comme substrat de l'enzyme artificielle pour la réaction de Baeyer-Villiger. Ainsi, ce système permettrait d'oxyder un alcool secondaire directement en lactone en utilisant simplement O<sub>2</sub>, dans l'eau et en ne produisant aucun sous-produit, excepté de l'eau (Figure 129).

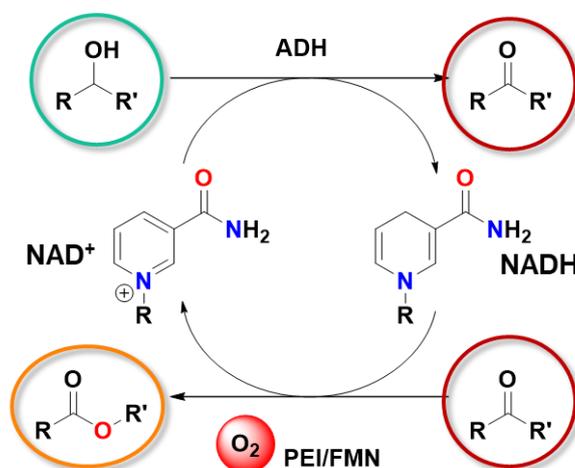


Figure 129 : Recyclage du NADH par une alcool déshydrogénase pour une réaction tandem d'un alcool secondaire en ester avec l'enzyme artificielle.

L'ADH utilisée est disponible commercialement, mais elle est décrite comme étant spécifique à l'éthanol. Or l'enzyme artificielle requiert l'utilisation de cétones cycliques tendues (cyclobutanone) pour pouvoir effectuer des réactions de Baeyer-Villiger. Plusieurs alcools ont donc été testés en comparaison avec l'éthanol pour leur aptitude à réduire NAD<sup>+</sup> (Figure 130). L'isopropanol et le

cyclobutanol (150 mM) se sont ainsi avérés être de bons substrats de l'ADH avec une régénération totale de 400  $\mu\text{M}$  de NADH en quelques minutes lors de l'utilisation du cyclobutanol et en 1 heure lors de l'utilisation de l'isopropanol. Etonnamment, concernant l'éthanol, seule la moitié du  $\text{NAD}^+$  engagé est réduite après 3 heures de réaction. Notre choix s'est donc naturellement porté vers le cyclobutanol pour tester le système (Figure 131).

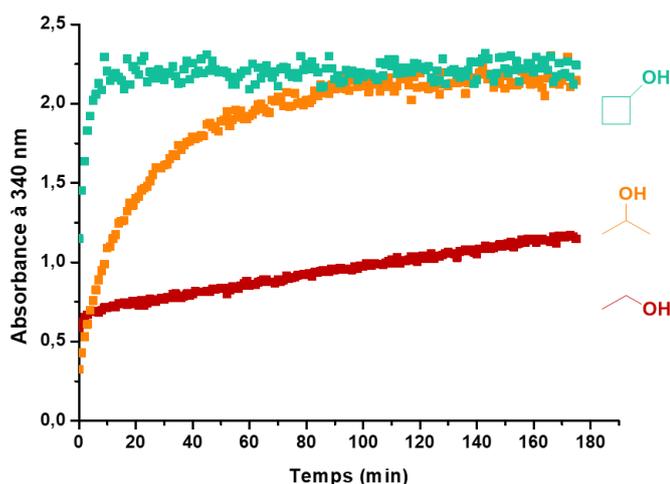


Figure 130 : Evolution de l'absorbance à 340 nm après l'ajout de  $\text{NAD}^+$  (400  $\mu\text{M}$ ) à une solution d'ADH (200 nM), et de 150 mM de cyclobutanol (■), d'isopropanol (●) ou d'éthanol (▲) dans une solution tamponnée à pH = 8,0 (HEPES (50 mM)) à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Suite à ces résultats, une réaction d'oxydation a été réalisée avec le cyclobutanol (10 mM) en présence de l'enzyme artificielle (FMN 5  $\mu\text{M}$  et  $\text{PEI}_{\text{ref}}$  5 mM), d'une ADH (200 nM) et de  $\text{NAD}^+$  (1 mM). Cependant, après analyse par chromatographie en phase gazeuse, seule la formation de cyclobutanone (2 mM) est observée, sans trace de lactone. Ce résultat amène à se poser plusieurs questions :

- L'enzyme naturelle est-elle stable dans les conditions utilisées?
- L'enzyme artificielle inhibe-t-elle l'enzyme naturelle ou inversement ?
- Y-a-t-il assez de substrat disponible pour réaliser l'oxydation ?

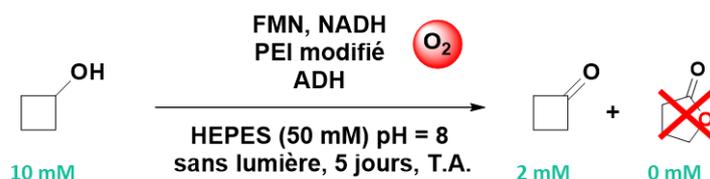


Figure 131 : Réaction tandem du cyclobutanol (10 mM) avec une alcool déshydrogénase (200 nM) en présence de l'enzyme artificielle (FMN (5  $\mu\text{M}$ ),  $\text{PEI}_{\text{ref}}$  (5 mM)) et de  $\text{NAD}^+$  (1 mM) dans une solution tamponnée à pH = 8,0 (HEPES (50 mM)) à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Afin de répondre à ces questions, de nouvelles études par spectroscopie UV-visible ont été entreprises.

**b) Etude du système complet associant l'enzyme artificielle à l'ADH**

Dans un premier temps, l'effet de 5 mM de polymère fonctionnalisé ( $\text{PEI}_{\text{ref}}$ ) sur l'ADH (200 nM) a été testé et la Figure 132A nous montre l'absorbance à 340 nm en fonction du temps. On remarque clairement que l'ajout de  $\text{PEI}_{\text{ref}}$  inhibe complètement la réduction de  $\text{NAD}^+$  (400  $\mu\text{M}$ ) et donc vraisemblablement l'activité de l'ADH. Pour éviter l'interaction entre les deux macromolécules, des membranes de dialyse peuvent être utilisées (Figure 133). Ainsi, en plaçant le polymère et la FMN dans un compartiment et l'alcool déshydrogénase dans l'autre compartiment, il est possible de résoudre ce problème et l'ADH retrouve son activité optimale.

L'autre problème envisageable est que l'enzyme naturelle puisse être dégradée par le peroxyde d'hydrogène généré par l'enzyme artificielle en cours de catalyse. Nous avons donc incubé l'ADH en présence de peroxyde d'hydrogène (0,5 mM et 1 mM) durant 3 h avant d'ajouter l'isopropanol et le  $\text{NAD}^+$ . La Figure 132B montre clairement que le peroxyde d'hydrogène inhibe complètement l'activité de l'alcool déshydrogénase.

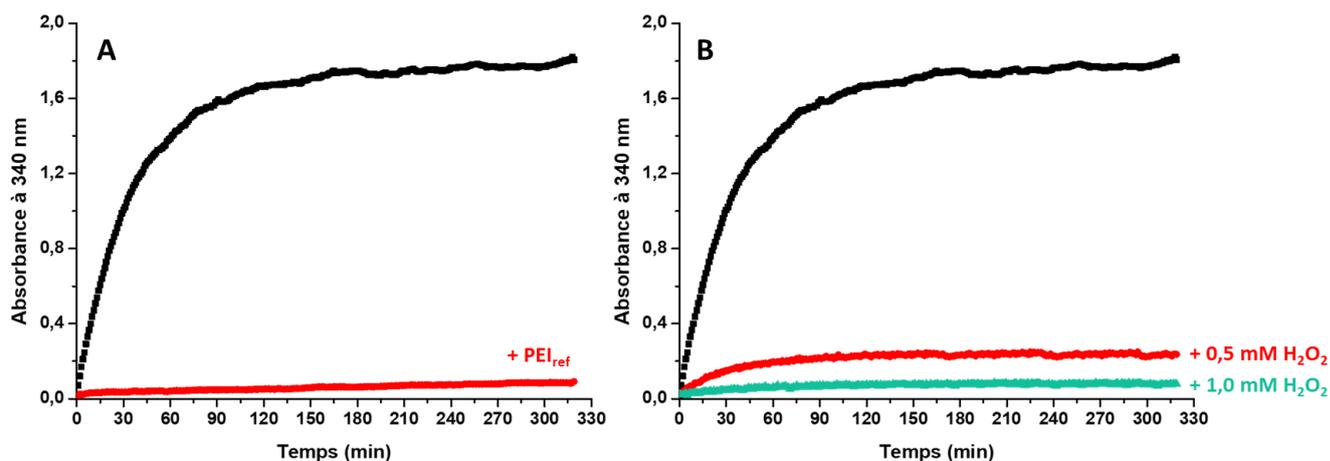


Figure 132 : A) Evolution de l'absorbance à 340 nm après ajout de  $\text{NAD}^+$  ( $400 \mu\text{M}$ ) : A) dans une solution d'ADH ( $200 \text{ nM}$ ), d'isopropanol ( $100 \text{ mM}$ ) (■) et de  $\text{PEI}_{\text{ref}}$  ( $5 \text{ mM}$ ) (●) dans une solution tamponnée à  $\text{pH} = 8,0$  (HEPES  $50 \text{ mM}$ ). B) dans une solution d'ADH ( $200 \text{ nM}$ ), d'isopropanol ( $100 \text{ mM}$ ) (■) et après 3 h d'incubation avec  $0,5 \text{ mM}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (●) ou  $1 \text{ mM}$  (▲) dans une solution tamponnée à  $\text{pH} = 8,0$  (HEPES  $50 \text{ mM}$ ).

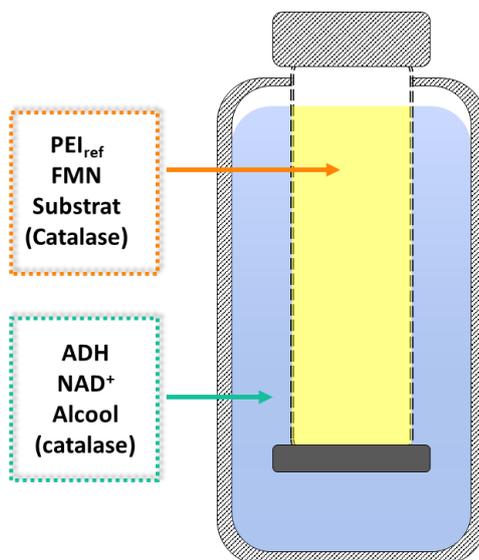


Figure 133 : Représentation schématique de la compartimentalisation de l'enzyme naturelle et artificielle.

L'ajout de catalase ( $10 \text{ nM}$ ) a donc été envisagé pour éliminer  $\text{H}_2\text{O}_2$  au fur et à mesure de sa formation en solution. Malheureusement, même en présence de catalase avec le système de compartimentalisation, aucune activité de type Baeyer-Villiger n'a pu être observée ni avec le cyclobutanol ( $10 \text{ mM}$ ), ni avec la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one ( $10 \text{ mM}$ ) en présence d'isopropanol (Figure 134).

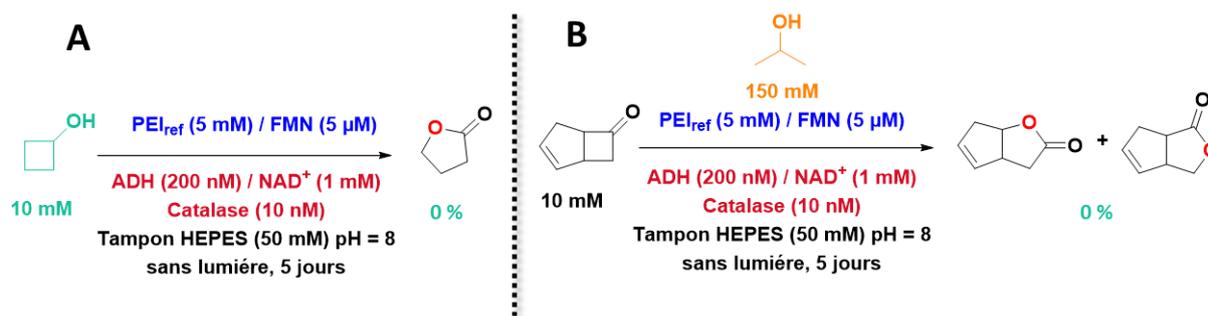


Figure 134 : A) Réaction tandem du cyclobutanol avec compartimentalisation de l'alcool déshydrogénase (200 nM) et de l'enzyme artificielle (FMN (5 μM), PEI<sub>ref</sub> (5 mM)), en présence de NAD<sup>+</sup> (1 mM) et de cyclobutanol (10 mM), dans une solution tamponnée à pH = 8,0 (HEPES 50 mM) à température ambiante et sous pression atmosphérique. B) Oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) avec compartimentalisation de l'alcool déshydrogénase (200 nM) et de l'enzyme artificielle (FMN (5 μM), PEI<sub>ref</sub> (5 mM)), en présence de NAD<sup>+</sup> (1 mM) et de cyclobutanol ou d'isopropanol (150 mM), dans une solution tamponnée à pH = 8,0 (HEPES 50 mM) à température ambiante et sous pression atmosphérique.

D'autres souches d'alcool déshydrogénase pourront être utilisées dans l'espoir de trouver une enzyme plus résistante dans les conditions expérimentales utilisées. La stabilisation de l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine est également un point clé à résoudre, qui permettrait d'utiliser l'enzyme sans formation de peroxyde d'hydrogène et donc sans dégradation de celle-ci.

### 3. Utilisation de la formiate déshydrogénase (FDH)

Pour nous focaliser sur la régénération du NADH, nous avons envisagé de développer un processus plus simple utilisant la formiate déshydrogénase (FDH) pour réduire NAD<sup>+</sup> en NADH. La FDH utilise le formiate comme substrat sacrificielle, qui est un composé très simple, peu coûteux et non toxique. L'enzyme possède un autre avantage : la réaction ne produit que du CO<sub>2</sub> comme sous-produit. De plus, l'utilisation de ce système ne nous restreint pas uniquement à des réactions de type Baeyer-Villiger, il peut être élargi à une gamme plus large de réactions incluant sulfoxydation, N-oxydation ect... La disponibilité commerciale de la FDH constitue également un avantage certain pour son utilisation dans notre système.

Pour toutes les expériences qui suivront, l'activité de la FDH sera mesurée suivant la cinétique de réduction du NAD<sup>+</sup> en NADH à 340 nm comme pour l'ADH précédemment.

a) Etude par spectroscopie UV-visible

Pour ne pas reproduire les mêmes erreurs qu'avec l'alcool déshydrogénase, plusieurs contrôles ont tout d'abord été effectués. Premièrement, le pH optimal de l'enzyme se situe au voisinage de pH = 8, ce qui est un premier point positif, considérant le fait que l'enzyme artificielle fonctionne également mieux à pH basique. Par ailleurs, il est important de noter que pour atteindre son activité optimale l'enzyme requiert l'utilisation de concentration élevée en formiate de l'ordre de 0,5 M.

Dans un premier temps, l'influence de la formiate déshydrogénase (20 nM) sur l'oxydation de NADH (200  $\mu$ M) par l'enzyme artificielle (FMN 1  $\mu$ M et PEI<sub>ref</sub> 1 mM) a été étudiée (Figure 135A). On observe que l'ajout de FDH réduit de moitié l'activité de l'enzyme artificielle. Ensuite, la Figure 135B montre l'influence du polymère de référence (0-10 mM) sur la réduction du NAD<sup>+</sup> (400  $\mu$ M) par la FDH(200 nM) et en présence de formiate de sodium (150 mM). On remarque que l'ajout de polymère n'a quasiment aucune influence sur la réduction de NAD<sup>+</sup> par la FDH.

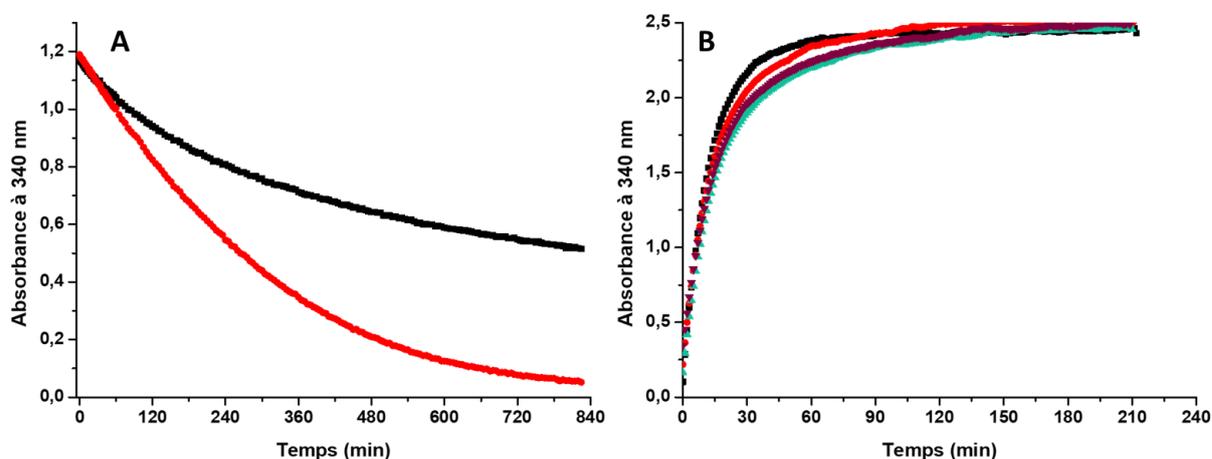


Figure 135 : A) Evolution de l'absorbance à 340 nm après l'ajout de NADH (200  $\mu$ M) dans une solution de FMN (1  $\mu$ M) et de PEI<sub>ref</sub> (1 mM) (●) et de FDH (20 nM) (■) dans une solution tamponnée à pH = 7,6 (HEPES (50 mM)). B) Evolution de l'absorbance à 340 nm après l'ajout de NAD<sup>+</sup> (400  $\mu$ M) dans une solution de FDH (200 nM) et de HCOONa (150 mM) (■) et en présence de 1 mM de PEI<sub>ref</sub> (●), 5 mM de PEI<sub>ref</sub> (▲), 10 mM de PEI<sub>ref</sub> (▼) dans une solution tamponnée à pH = 7,6 (HEPES (50 mM)).

Un autre point à considérer est la stabilité de la FDH vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. Pour cela, on incube la FDH (200 nM) avec 0,5 mM et 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant 24h avant d'ajouter NAD<sup>+</sup> (400  $\mu$ M) et le formiate de sodium (100 mM). On remarque sur la Figure 136A que lorsque l'enzyme est

incubée durant 24 h avec du peroxyde d'hydrogène, une perte d'activité est observée. Il faut à présent 5 h pour réduire la totalité du NAD<sup>+</sup> contre 1 h en absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais cette perte d'activité est nettement moins prononcée que pour l'alcool déshydrogénase qui perdait totalement son activité. Concernant l'enzyme artificielle, l'influence du formiate de sodium (0-200 mM) sur l'oxydation du NADH (400 μM) a également été étudié. Pour des concentrations supérieures à 25 mM en formiate de sodium, l'activité de l'enzyme artificielle est fortement impactée. En effet, seulement 75 % du NADH est oxydé en présence de 100 mM de formiate et 45 % avec 200 mM après 24 h de réaction. Il est possible qu'à fortes concentrations, le formiate entre en compétition avec la FMN et le NADH en saturant les « sites actifs » du polymère, diminuant la probabilité qu'une molécule de FMN se retrouve à proximité d'une molécule de NADH.

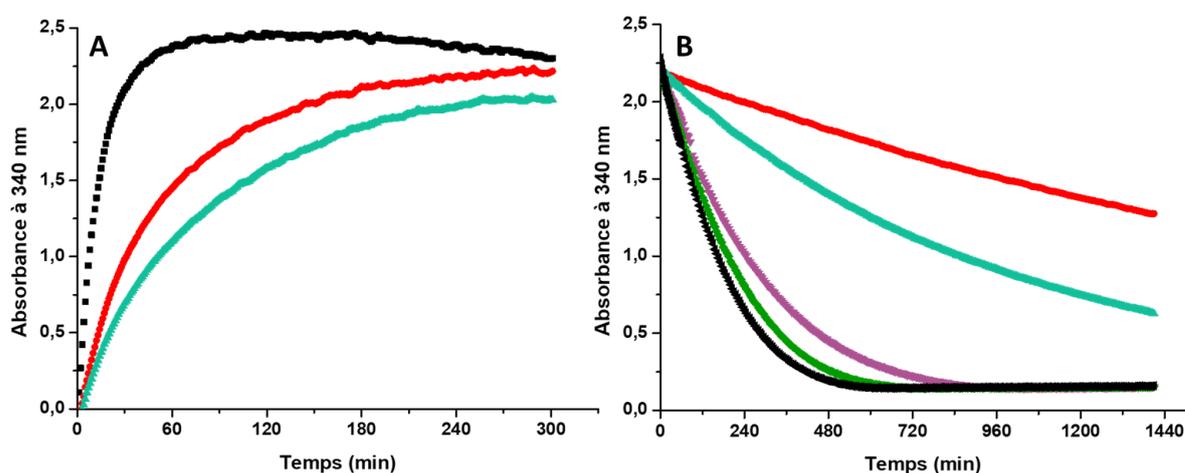


Figure 136 : A) Evolution de l'absorbance à 340 nm après l'ajout de NAD<sup>+</sup> (400 μM) dans une solution de FDH (200 nM), HCOONa (100 mM) (■) et après 24 h d'incubation avec 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (●) ou 1 mM (▲) dans une solution tamponnée à pH = 7,6 (HEPES (50 mM)). B) Evolution de l'absorbance à 340 nm après l'ajout de NADH (400 μM) dans une solution de FMN (2 μM), de PEI<sub>ref</sub> (2 mM) (■) et en présence de 200 mM de HCOONa (●), de 100 mM de HCOONa (▲), de 25 mM de HCOONa (▼) et de 1 mM de HCOONa (◆) dans une solution tamponnée à pH = 7,6 (HEPES (50 mM)).

Plusieurs paramètres devront donc être pris en considération de façon à trouver les conditions expérimentales permettant à la FDH de fonctionner, tout en conservant l'activité Baeyer-Villiger du catalyseur bio-inspiré. Chaque paramètre a donc été évalué lors de la catalyse d'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one par le catalyseur bio-inspiré PEI<sub>ref</sub>-FMN en présence de FDH et de NAD<sup>+</sup>.

b) Optimisation des conditions réactionnelles pour le système complet

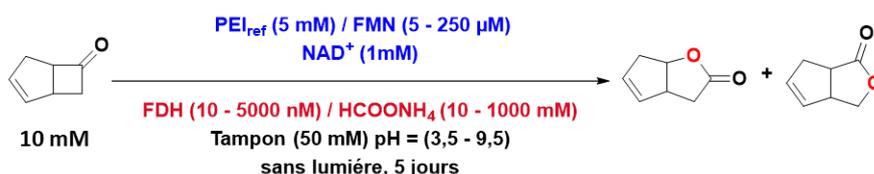
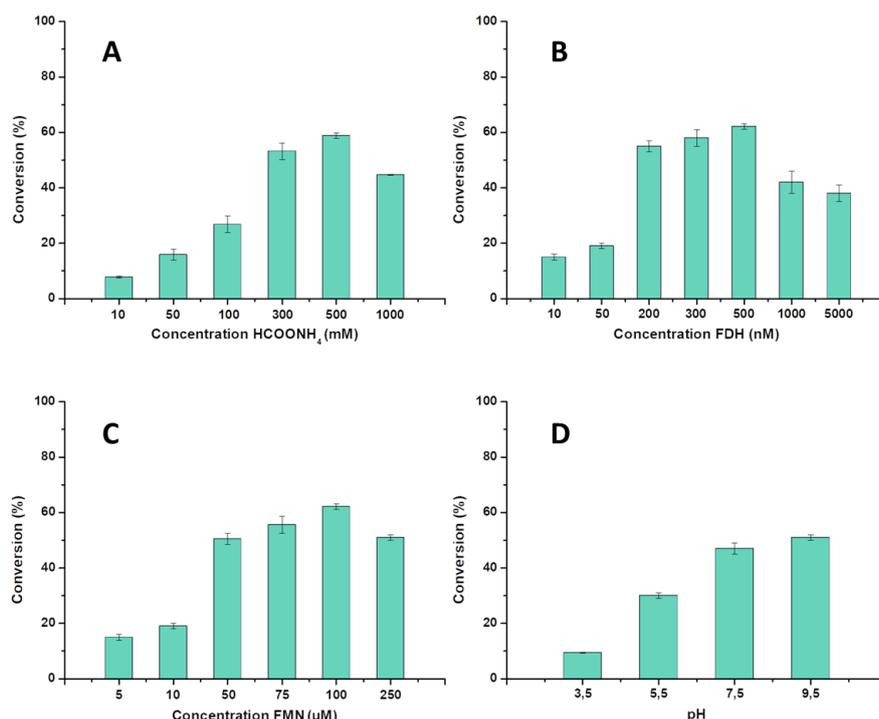


Figure 137 : Oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one catalysé par l'enzyme artificielle et en présence de FDH et de formiate d'ammonium pour régénérer le NAD<sup>+</sup>.

L'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) (Figure 137) a été conduite à température ambiante et sous pression atmosphérique durant 5 jours dans des solutions tamponnées en faisant varier la concentration en formiate d'ammonium de 0 à 1M (Figure 138 A), en FDH de 0 à 5 μM (Figure 138B), en FMN de 0 à 200 μM (Figure 138C) et le pH de 3,5 à 9,5 (Figure 138D). De plus, après avoir observé la forte entrave du formiate de sodium sur l'enzyme artificielle, l'idée d'utiliser le formiate d'ammonium a été envisagée dans l'espoir de réduire la concurrence entre la FMN et le formiate.

Les études en fonction de la concentration en formiate d'ammonium (Figure 138A) montrent qu'il est nécessaire de travailler avec des concentrations élevées en formiate (60% de conversion à 500 mM). Cependant, des concentrations supérieures à 500 mM en formiate semblent néfastes au système. Il est ainsi probable que le formiate sature les groupements guanidinium du polymère, empêchant l'interaction spécifique du polymère avec le NADH et la FMN. Les études en fonction des concentrations de FMN (Figure 138C) et de FDH (Figure 138B) ont permis de déterminer respectivement des concentrations optimales de 100 μM pour la FMN et 500 nM pour la FDH. Une concentration trop élevée en FMN provoque la précipitation du système, qui n'est alors plus opérationnel. Dans le cas de la formiate déshydrogénase, une concentration trop faible ne permet pas de régénérer le NADH assez rapidement. Enfin, les études en fonction du pH (Figure 138D) ont permis de montrer que les meilleures conversions étaient obtenues à pH basique (pH = 9,5). Il a été montré précédemment que l'enzyme artificielle avait une meilleure activité à pH basique et il est décrit dans la littérature que le pH optimal de la formiate déshydrogénase se situe également à pH basique. Il est donc naturel que le système présente une activité optimale à pH basique.

## Chapitre 4 : Evolution des conditions catalytiques



**Figure 138 : Optimisation des différents paramètres pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM).** A) Oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en présence de FMN (5 μM), PEI (5 mM), NAD<sup>+</sup> (1 mM), FDH (500 nM), et différente concentration de HCOONH<sub>4</sub> (10 – 1000 mM) dans une solution tamponnée à pH = 7,6 (HEPES (50 mM)). B) Oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en présence de FMN (5 μM), PEI (5 mM), NAD<sup>+</sup> (1 mM), HCOONH<sub>4</sub> (500 mM), et différente concentration de FDH (10 – 5000 nM) dans une solution tamponnée à pH = 7,6 (HEPES (50 mM)). C) Oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en présence de PEI (5 mM), NAD<sup>+</sup> (1 mM), FDH (500 nM), HCOONH<sub>4</sub> (500 mM), et différente concentration de FMN (5 – 250 μM) dans une solution tamponnée à pH = 7,6 (HEPES (50 mM)). D) Oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) en présence de FMN (5 μM), PEI (5 mM), NAD<sup>+</sup> (1 mM), FDH (500 nM), HCOONH<sub>4</sub> (500 mM) à différents pH (3,5 – 9,5), dans une solution tamponnée à température ambiante et sous pression atmosphérique durant 5 jours.

En parallèle, l'étude cinétique du système combinant l'enzyme artificielle (FMN 100 μM et PEI<sub>ref</sub> 5 mM) et une FDH (500 nM) en présence de formiate de sodium (500 mM) a permis de déterminer le temps optimal pour réaliser l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) (Figure 139). La concentration en lactone atteint un plateau après 6 jours de réaction avec un rendement de 50% et une sélectivité de 90 % pour la **lactone 1**. Le fait de ne pas observer une conversion quantitative du substrat en lactone signifie que le système se dégrade en cours de réaction, car le formiate en large excès devrait permettre une conversion quantitative. Cela provient probablement de la combinaison de plusieurs facteurs, dont la stabilité de NADH en solution ou encore la dégradation progressive de la FDH par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

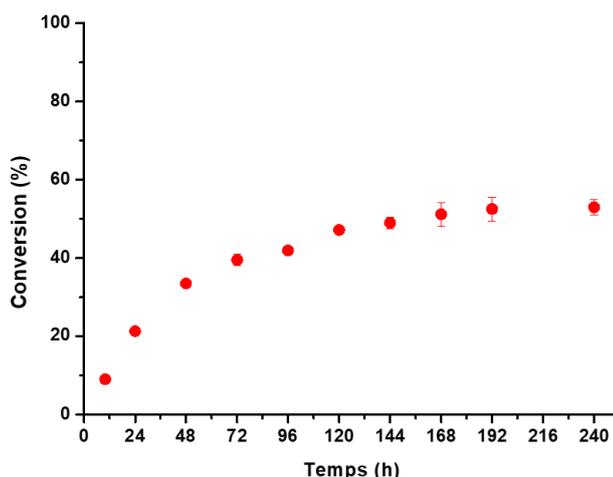


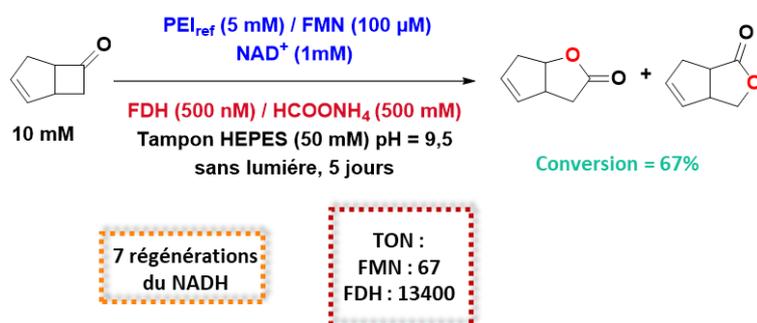
Figure 139 : Cinétique de formation des lactones 1 et 2 catalysée par l'enzyme artificielle (FMN : 100  $\mu$ M, PEI<sub>ref</sub> : 5 mM) en présence de FDH (500 nM), de HCOONa (300 mM), de NAD<sup>+</sup> (1 mM) et de bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (10 mM) dans une solution tamponnée à pH = 9,5 (CHES (50 mM)), à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Suite à cette phase d'optimisation, les conditions optimales mises au point précédemment (FMN (100  $\mu$ M), PEI<sub>ref</sub> (5 mM), FDH (500 nM), formiate d'ammonium (500 mM) dans un tampon CHES à pH = 9,5) ont permis d'obtenir une conversion maximale de 67% pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (Tableau 22). Cela signifie que le **NADH a pu être régénéré jusqu'à 7 fois, que la FMN a effectué 70 turn-over** alors que la FDH en plus faible concentration **en a effectué 13 000**. Ces conditions ont également été appliquées à différents substrats pour d'autres oxydations de Baeyer-Villiger ou sulfoxydation (Figure 140). Comme on pouvait s'y attendre, l'utilisation du nouveau système ne permet pas d'oxyder les substrats déjà récalcitrants avec l'enzyme artificielle utilisée seule (cyclobutanone, cyclopentanone, adamantanone et thioanisole). Pour les autres substrats, de bons taux de conversions, supérieur à 50 %, ont été obtenus.

Concernant les expériences de contrôle, réalisées en absence de FMN, de FDH, de NAD<sup>+</sup> ou de formiate, elles ont conduit à une conversion d'environ 2 % (oxydation résiduelle déjà observée lorsqu'on laisse le substrat seul dans l'eau). En revanche, le système conserve une activité assez élevée en absence de polymère, avec une conversion de 40 %. Cela peut s'expliquer par le fait qu'une concentration élevée de FMN favorise sa réaction avec NADH en absence de polymère. Par ailleurs, la FMN peut potentiellement interagir avec des poches hydrophobes de la FDH, favorisant ainsi sa réactivité avec NADH. Phénomène qui avait d'ailleurs déjà été observé lors de l'interaction de la FMN avec la papaïne.<sup>[148]</sup>

## Chapitre 4 : Evolution des conditions catalytiques

Tableau 22 : Conditions optimisées pour l'oxydation de la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one catalysé par l'enzyme artificielle et en présence de FDH et de formiate d'ammonium.



Conditions optimales	
HCOONH <sub>4</sub>	500 mM
PEI <sub>ref</sub>	5 mM
FMN	100 µM
FDH	500 nM
NAD <sup>+</sup>	1 mM
Tampon (pH)	HEPES (50 mM) pH = 9,5

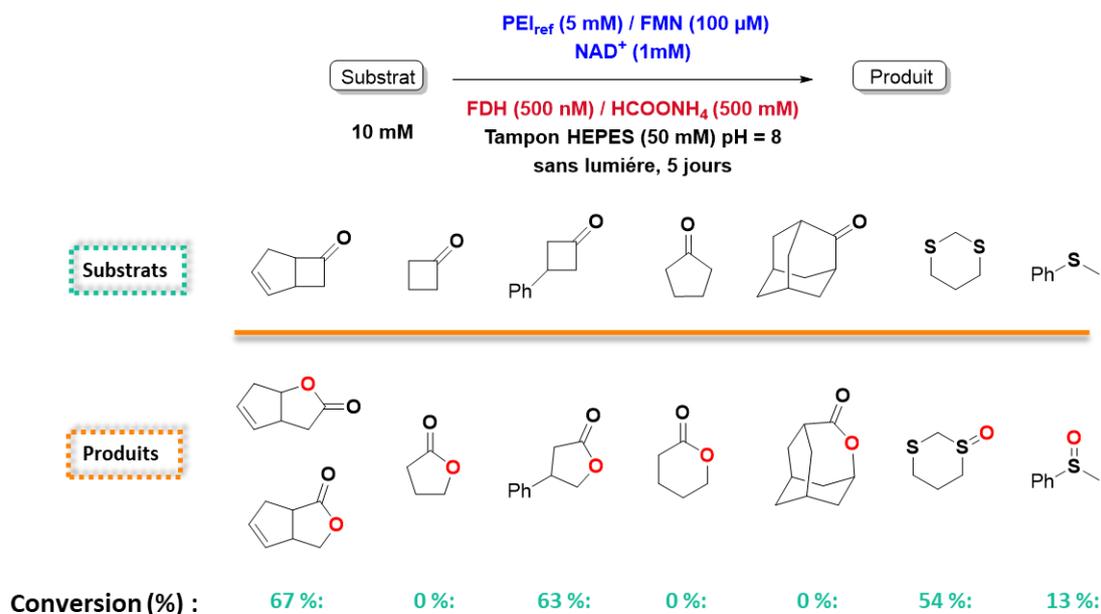


Figure 140 : Oxydation de divers substrats (cétones ou thioéthers) (10 mM) catalysée par l'enzyme artificielle (FMN : 100 µM, PEI : 5 mM) en présence de FDH (500 nM), de HCOONH<sub>4</sub> (500 mM) et de NAD<sup>+</sup> (1 mM) dans une solution tamponnée à pH = 9,5 (CHES (50 mM)), à température ambiante et sous pression atmosphérique.

Théoriquement, le système devrait pouvoir fonctionner de façon infinie, jusqu'à consommation totale du substrat ou du formiate. Or, ce n'est pas le cas pour notre système en raison de la dégradation de certains composants clés. Nous avons déjà observé la dégradation de la FDH par  $H_2O_2$  qui diminue l'efficacité de l'enzyme, empêchant la régénération du NADH et donc le maintien d'une concentration suffisante pour le bon fonctionnement de l'enzyme artificielle.

L'autre problème qui limite le système est la dégradation du NADH au cours du temps, comme l'illustre la Figure 141 qui montre une diminution de la concentration de plus de la moitié en 4 jours.

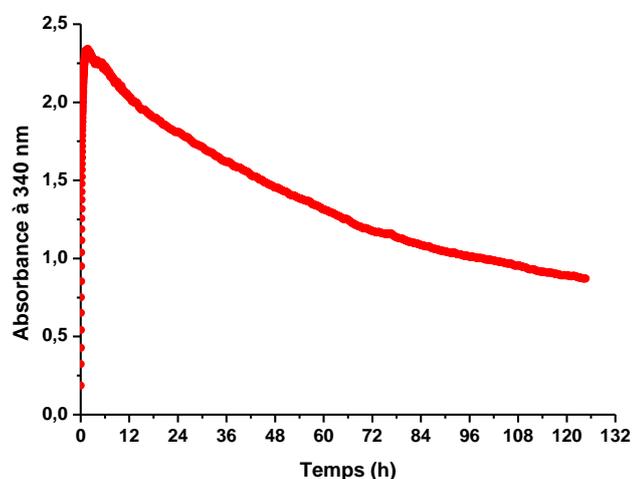


Figure 141 : Evolution de l'absorbance à 340 nm après l'ajout de  $NAD^+$  ( $400 \mu M$ ) dans une solution contenant l'enzyme artificielle (FMN :  $40 \mu M$ , PEI :  $2 mM$ ) en présence de FDH ( $200 nM$ ), de  $HCOONH_4$  ( $500 mM$ ), dans une solution tamponnée à  $pH = 7,6$  (HEPES ( $50 mM$ )), à température ambiante et sous pression atmosphérique.

#### 4. Conclusion

Pour résumer, la robustesse de la FDH a permis de l'utiliser avec l'enzyme artificielle et d'obtenir un nouveau système capable de régénérer efficacement le NADH et d'obtenir de bons rendements en oxydation. Cependant, la nécessité d'augmenter les concentrations en FMN diminue l'impact du polymère et permet au système de fonctionner très convenablement en absence du polymère.

### III. Conclusion

Pour conclure, nous avons indiqué en début de chapitre le coût élevé du NADH et notre objectif de nous affranchir de cette contrainte soit en le régénérant, soit en le remplaçant par un autre réducteur.

L'ascorbate de sodium a tout d'abord été utilisé en remplacement du NADH. Les résultats obtenus en catalyse d'oxydation se sont avérés mitigés : certes, l'architecture supramoléculaire du polymère permet à l'ascorbate de sodium de réduire efficacement la FMN et de réaliser l'oxydation de divers substrats avec de bons rendements, mais l'objectif de travailler en conversion, avec des quantités stœchiométriques, voir sur-stœchiométrique en ascorbate s'est avéré plus compliqué en raison de la réactivité entre l'ascorbate de sodium et le peroxyde d'hydrogène formé *in situ*.

Cependant, un résultat a attiré notre attention lors des différentes études spectroscopiques réalisées. Il semble que l'utilisation de l'ascorbate de sodium permet la formation d'un radical flavinique (flavine semiquinone anionique ou neutre) qui est ensuite stabilisé plusieurs heures au sein des poches hydrophobes du polymère modifié. Des études RPE sont encore nécessaires pour confirmer la formation de ce radical.

Les résultats préliminaires obtenus pour l'activité radicalaire démontrent bien que le système est capable d'initier des réactions radicalaires. La recherche de meilleures conditions réactionnelles est nécessaire pour améliorer les rendements de ces réactions.

La seconde option envisagée était la régénération du NADH à l'aide d'une enzyme naturelle. L'utilisation de l'alcool déshydrogénase (ADH) pour réaliser des réactions tandem dans un premier temps n'as pas permis d'atteindre les objectifs escomptés en raison de son instabilité en présence du peroxyde d'hydrogène formé par l'enzyme artificielle. L'utilisation d'une seconde enzyme a donc été envisagée.

Ainsi, l'utilisation de la formiate déshydrogénase (FDH) a permis de mettre au point un nouveau système combinant une enzyme naturelle pour la régénération du NADH et une enzyme artificielle pour l'oxydation de divers substrats organiques. La formation de peroxyde d'hydrogène est également un problème pour cette enzyme naturelle, mais dans une moindre mesure par comparaison avec l'alcool déshydrogénase. Afin d'obtenir un système plus performant, il est

impératif de résoudre le problème de formation du peroxyde d'hydrogène en stabilisant l'intermédiaire peroxyflavine au sein du polymère.

L'utilisation d'autre déshydrogénase (aldéhyde, acétaldéhyde ou lactate déshydrogénase ect...) ou l'utilisation d'autres méthodes de régénération comme l'utilisation de procédés électrochimiques sont des options envisageables pour régénérer le NADH.



## **Conclusion et perspectives**

### **I. Conclusion**

L'objectif principal de ces travaux était d'utiliser une flavoprotéine artificielle déjà décrite au laboratoire comme réductase artificielle. Pour d'une part, utiliser le flux monoélectronique généré par les flavines de façon à initier des réactions radicalaires en conditions anaérobies et, d'autre part, activer le dioxygène et catalyser des réactions d'oxydation de type Baeyer-Villiger comme le font les Baeyer-Villiger Monooxygénases (BVMOs) en conditions aérobies.

Une série de polymères a donc été synthétisée à partir d'un polyéthylèneimine multibranché hydrosoluble de 25 kDa (PEI) fonctionnalisé avec différents groupements de type guanidinium, octyle, acide carboxylique ou bi-naphtalène, de façon à obtenir une bibliothèque de polymères bi- ou tri-fonctionnalisés qui ont tous été caractérisés par spectroscopie RMN du proton.

Ces polymères ont ensuite été utilisés pour assembler les enzymes artificielles par incorporation de la flavine mononucléotide (FMN) dans leur microenvironnement hydrophobe localement polarisé. Concernant leur réactivité avec le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) en conditions aérobies, nous avons clairement pu mettre en évidence que l'entité macromoléculaire composée de polymère modifié et de FMN (**PEIm/FMN**) était capable d'oxyder un large excès de NADH de façon catalytique, suggérant que sa forme réduite pouvait être réoxydée par le dioxygène *via* la formation d'un intermédiaire de type (hydro)peroxyflavine.

L'étape suivante a donc été d'étudier l'activité de ce système pour catalyser des réactions d'oxydation afin d'évaluer sa capacité à oxyder de petites molécules par activation réductrice du dioxygène. L'enzyme artificielle s'est ainsi montrée particulièrement efficace pour oxyder un substrat modèle (la bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one) avec un rendement de 70 % et une excellente sélectivité dans l'eau, à température ambiante et sous pression atmosphérique. Ce résultat constitue le premier exemple de catalyseur bio-inspiré capable de réaliser des réactions d'oxydations de type Baeyer-Villiger, en solution aqueuse, avec une flavine non modifiée et en utilisant directement l'oxygène de l'air dans des conditions douces de pression et de température.

La gamme de substrats étudiés a ensuite été étendue aux thioéthers ou aux cyclobutanones diversement substituées, en utilisant notamment un polymère chiral pour réaliser des réactions énantiosélectives. Au cours de ces études, le système a montré ses limites. Il semble en effet que

## Conclusion et perspectives

l'instabilité de l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine puisse conduire à la formation de peroxyde d'hydrogène en cours de catalyse et que ce soit ce dernier qui réalise l'oxydation. Cela constitue l'inconvénient majeur du système, limitant pour l'instant son utilisation à l'oxydation de cyclobutanones. La diffusion de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hors du polymère semble également empêcher toute induction asymétrique qui ne sera envisageable que si l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine est davantage stabilisé pour permettre à la réaction de se dérouler dans l'environnement chiral du polymère. L'autre problème du système est qu'il nécessite l'utilisation d'un large excès de substrat pour fonctionner, ce qui nous empêche d'obtenir de bons résultats en conversion (réducteur et substrat en proportion stœchiométrique). Moins de 50% de conversion a ainsi été obtenue. Enfin, compte tenu du coût élevé de NADH, nous avons cherché une solution pour nous affranchir de son utilisation et deux options nous ont semblé intéressantes : (i) remplacer le NADH par un autre réducteur ou (ii) le régénérer en solution<sup>[149]</sup>.

L'utilisation de l'ascorbate de sodium a été un choix évident pour le remplacement du NADH. En effet, il était déjà décrit dans la littérature capable de réduire des flavines, son utilisation est compatible avec les conditions réactionnelles du système **PEIm-FMN** et il présente un coût 600 fois moins élevé que celui de NADH. L'ascorbate de sodium s'est montré efficace pour réduire la FMN, ce qui a permis au système de réaliser des réactions d'oxydations avec des rendements similaires à ceux obtenus avec le NADH pour les réactions réalisées en excès de substrat. Cependant, son utilisation en quantité stœchiométrique par rapport au substrat s'est avérée moins efficace que l'utilisation de NADH et les conversions observées n'ont pas excédé 12%. Il semble encore une fois que la formation *in situ* de peroxyde d'hydrogène pose problème, probablement à cause d'une réactivité plus forte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec l'ascorbate qu'avec NADH.

Sur un plan mécanistique, des études spectroscopiques lors de l'utilisation de l'ascorbate ont pu démontrer la formation de flavines semiquinone à la fois sous la forme anionique et neutre, stabilisées par le polymère modifié. Ces résultats constituent la première étude par spectroscopies UV-visible et de fluorescence d'une telle espèce en dehors des systèmes enzymatiques. Des études RPE sont toujours en cours afin de confirmer la formation et la stabilisation de ce radical flavinique.

Parallèlement à l'observation de cet intermédiaire radicalaire, l'équipe du Prof. Goddard, avec qui nous collaborons dans le cadre du projet ANR « ARTENOSYN », a pu montrer que ce même système pouvait catalyser des réactions de couplage C-C radicalaires. Dans le cadre de cette étude,

## Conclusion et perspectives

nos études RPE ont permis de démontrer le caractère radicalaire de la réaction grâce à l'utilisation d'un piègeur de radical de type nitrovide.

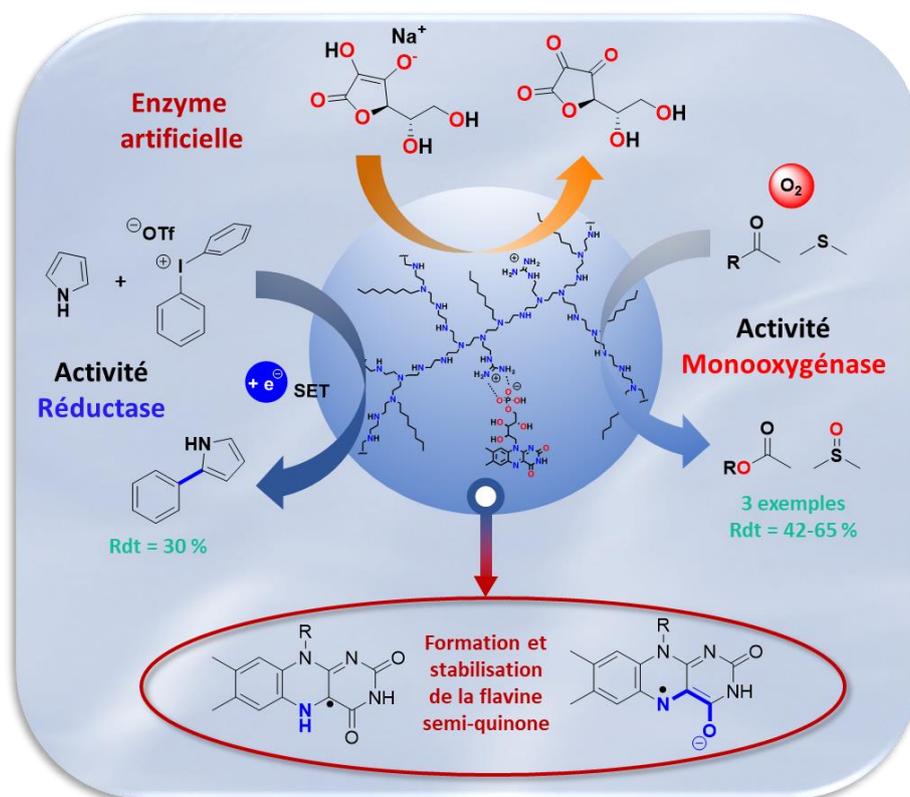


Figure 142 : Différentes réactions catalysées par l'enzyme artificielle en présence d'ascorbate de sodium comme réducteur.

En parallèle, la régénération du NADH par voie chimique ou enzymatique a également été étudiée. L'utilisation d'un complexe d'iridium s'est montrée problématique en raison de la génération de peroxyde d'hydrogène catalysée par ce complexe en présence de formiate. Nous avons donc rapidement abandonné cette option. Concernant sa régénération par voie enzymatique, deux enzymes ont été considérées : la formiate déshydrogénase (FDH) et l'alcool déshydrogénase (ADH). L'instabilité de l'ADH en présence de peroxyde d'hydrogène et de polymère a rendu l'étude complexe. Malgré des tentatives pour remédier à ces problèmes, la fragilité de cette enzyme ne nous a pas permis d'obtenir les résultats souhaités.

La FDH, en revanche, s'est montrée nettement plus robuste aux conditions réactionnelles utilisées. Cette combinaison originale entre une enzyme naturelle et une autre artificielle a conduit à de très bons taux de conversions de certains substrats (conversion de 70% pour la bicyclo[3.2.0]hept-

2-en-6-one) grâce à 7 cycles de régénération du NADH en solution, ce qui ouvre des perspectives intéressantes pour le développement du système (Figure 143).

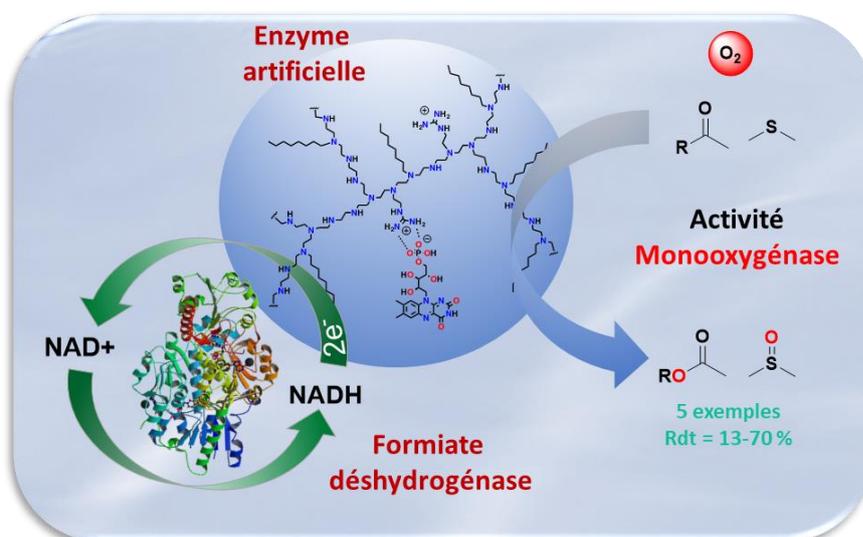


Figure 143 : Réactivité de l'enzyme artificielle en présence de formiate déshydrogénase pour régénérer le NADH .

## II. Perspectives

Les résultats décrits au cours de ce manuscrit ouvrent de nombreuses opportunités et pointent également les problèmes du système. En ce qui concerne l'amélioration de l'enzyme artificielle, des optimisations sont possibles à plusieurs niveaux. Une étude plus profonde des conditions expérimentales et d'analyse (spectrométrie de masse) pour la modification du polymère permettra peut-être d'obtenir des polymères beaucoup plus diversifiés qui pourront ainsi avoir plus d'influence sur la catalyse des réactions d'oxydation notamment en stabilisant l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine. La stabilisation de l'intermédiaire pourrait également être obtenue en utilisant des flavines alkylées en position  $\text{N}_3$  et/ou  $\text{N}_5$  qui ont déjà été décrites pour stabiliser l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine de dérivés flaviniques de synthèse, utilisés en solvant organique. La modification directe de la FMN naturelle et son utilisation en milieu aqueux reste un challenge important, mais des résultats préliminaires récemment obtenus au laboratoire, concernant la méthylation de la position  $\text{N}_3$  sont encourageants.

Stabiliser l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine est l'étape clé afin d'obtenir un système encore plus performant, ceci pourrait permettre d'obtenir de meilleurs résultats en catalyse énantiosélective, en favorisant les réactions directement à proximité de groupements chiraux. Cela

## *Conclusion et perspectives*

permettrait également d'éviter la formation de  $H_2O_2$ , qui est actuellement l'inconvénient majeur de ce système, notamment lors de l'utilisation d'ascorbate de sodium ou d'enzymes naturelles. La stabilisation de cette espèce pourrait également élargir la gamme de réactions possibles (époxydation, N-oxydation ect...). Pour cela, plusieurs possibilités s'offrent à nous, comme, par exemple, greffer davantage de groupements carboxylate pour aménager un environnement autour du cofacteur flavinique qui permette de stabiliser les intermédiaires flavine-OOH ou flavine-OO $\cdot$  par des interactions intermoléculaires de type liaisons H. Ou encore modifier les flavines en position N<sub>3</sub> et/ou N<sub>5</sub> par des substituants apportant des effets électroniques permettant la stabilisation de l'intermédiaire (hydro)peroxyflavine.

D'autres méthodes peuvent être envisagées pour la régénération du NADH, comme l'utilisation de procédés électrochimiques, l'utilisation d'autres déshydrogénase moins sensibles aux conditions réactionnelles (aldéhyde, acétaldéhyde ou lactate déshydrogénase ect...). De plus, en réduisant la formation de peroxyde d'hydrogène, de nouveaux tests de réaction tandem avec l'alcool déshydrogénase seront possibles.

A plus long terme, avec des conditions optimales, des réactions tandem pourront être envisagées. Il serait ainsi possible d'effectuer une première séquence de réactions en conditions anaérobies pour tirer profit du flux monoélectronique de la flavine réduite, et initier ainsi des réactions radicalaires conduisant par exemple à des couplages C-C, puis exposer le système à l'oxygène pour poursuivre avec une seconde séquence de réactions d'oxydations.



## **Partie expérimentale**

### **I. Matériels et méthodes**

La FMN, le NADH, l'ascorbate de sodium et le polymère (polyéthylèneimine multibranché de 25 kDa) sont des produits commerciaux et ont été achetés chez Alfa Aesar, Sigma Aldrich et Acros Organics et utilisés sans autre purification.

Tampons utilisés :

- MES (acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique) de pH 5 à 6,5,
- HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) de pH 7 à 8
- CHES (N-cyclohexyl-2-aminoéthanesulfonique) de pH 8,5-10

#### **1. Spectroscopie d'absorption électronique UV-visible**

Les expériences de spectroscopie d'absorption UV/visible ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Varian Cary 300 Bio, équipé d'un thermostat Varian Cary Temperature Controller et de cuves en quartz de 10 x 10 mm<sup>2</sup> x 20 mm équipées d'un septum pour les expériences réalisées sous atmosphère inerte. Le logiciel Cary WinUv a été utilisé pour l'enregistrement des spectres. La vitesse de balayage utilisée pour enregistrer des spectres est de 600 nm.min<sup>-1</sup>.

#### **2. Spectrométrie de masse**

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Bruker 2009 à analyseur tandem (quadripôle couplé à un temps de vol) équipé d'une source d'ionisation électrospray. Les concentrations des solutions injectées varient entre 10<sup>-4</sup> et 10<sup>-3</sup> mol.L<sup>-1</sup>.

#### **3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Les analyses par résonance magnétique nucléaire des composés et des polymères synthétisés ont été effectuées à l'aide de spectromètres Bruker, AC300 (300 MHz) et AC360 (360 MHz). Les échantillons ont été dissous dans du chloroforme, du méthanol, de l'éthanol ou de l'eau deutéré(e) (CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>OD ou D<sub>2</sub>O). Les déplacements chimiques sont donnés en partie par million (ppm) par rapport au TMS.

#### 4. Spectroscopie électronique de fluorescence

Toutes les expériences de fluorescence sont réalisées sur un appareil Tecan infinite M200 pro plate-reader, en utilisant des Microplaques de culture cellulaire, 96 puits, PS, Fd F, puit cheminée, noir, CELLSTAR® TC, stérile.

#### 5. Chromatographie en phase gazeuse (GC)

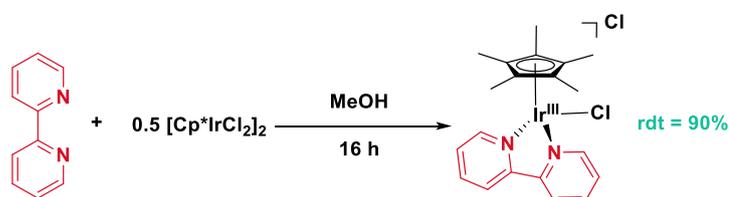
Toutes les expériences de GC sont réalisées sur un appareil SHIMADZU GC-2014A avec une colonne Zebron ZB Semi Volatiles (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ou une colonne Hydrodex g\_DiMOM (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm) pour les analyses chirales.

#### 6. Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

Les expériences de RPE sont réalisées sur un spectromètre Bruker Elexsys E 500 avec un cryostat à flux d'hélium liquide Oxford ESR 9 muni d'un thermocouple or-chrome positionné directement sous l'échantillon. Les expériences sont faites à 100 K ou à 298 K, avec une fréquence de 9,374 GHz, une puissance de 0,78 mW et une modulation de l'amplitude de 6 gauss.

## II. Synthèse

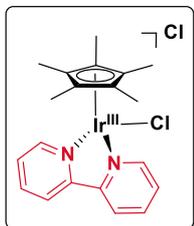
### 1. Synthèse du complexe d'iridium [Cp\*Ir(H-bpy)Cl]Cl



La 2,2-bipyridine (41 mg, 2,63 mmol, 2,1 eq.) et le complexe [Cp\*IrCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (100 mg, 1,26 mg, 1 eq.) sont agités durant une nuit à température ambiante dans le méthanol (10 mL). Après réaction, le méthanol est évaporé. Le solide jaune obtenu est recristallisé par diffusion d'éther dans le

méthanol. Le complexe  $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{H-bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$  est obtenu sous forme de cristaux jaunes avec un rendement de 91% (125 mg).

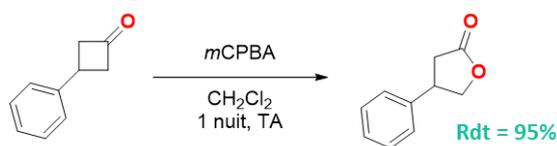
$[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{H-bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$  :



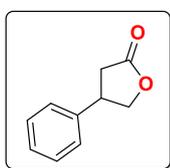
**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )** :  $\delta(\text{ppm}/\text{TMS}) = 9,00$  (d,  $J = 5,0$  Hz, 2H),  $8,64$  (d,  $J = 5,0$  Hz, 2H),  $8,28$  (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H),  $7,85$  (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H),  $1,72$  (s, 15H) ppm.

## 2. Synthèse des authentiques

- Synthèse de la 4-phényloxolan-2-one :



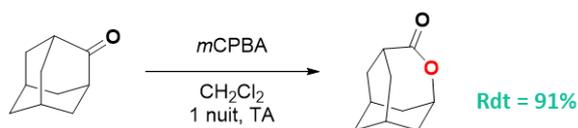
28 mg de *mCPBA* (1,5 eq.) sont ajoutés à une solution de cyclobutanone (11,3 mg, 1 eq.) dans le dichlorométhane (2 mL) et le mélange est agité durant une nuit à température ambiante, avant d'ajouter 5 équivalents de triéthylamine (5eq) puis de laver la phase organique à l'eau. La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3 x 10 mL), puis les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de  $\text{NaHCO}_3$  saturée, séchées avec  $\text{MgSO}_4$  et évaporées sous pression réduite. Le produit est obtenu sous forme de solide avec un rendement de 95% (11,8 mg).



**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )** :  $\delta(\text{ppm}/\text{TMS}) = 7,40\text{-}7,23$  (m, 5H),  $4,68$  (t,  $J = 8,5$  Hz, 1H),  $4,28$  (t,  $J = 8,5$  Hz, 1H),  $3,80$  (pent,  $J = 8,5$  Hz, 1H),  $2,93$  (dd,  $J = 8,5$  Hz,  $J = 17,5$  Hz, 1H),  $2,67$  (dd,  $J = 8,5$  Hz,  $J = 17,5$  Hz, 1H), ppm.

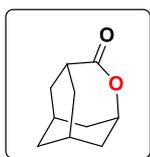
## Partie expérimentale

- Synthèse de la 4-Oxatricyclo[4.3.1.1<sup>3,8</sup>]undecan-5-one<sup>[150]</sup>:



### Mode opératoire :

Le mCPBA (287 mg, 1 eq.) est ajouté à une solution de tricyclo[4.3.1.1<sup>3,8</sup>]undecan-5-one (250 mg, 1 eq.) dans le dichlorométhane (2,5 mL) et le mélange est agité durant une nuit à température ambiante. Après réaction, le précipité blanc est filtré, et le filtrat est lavé avec une solution de NaOH (1 M) (3 x 10 mL). Le filtrat est ensuite extrait 3 fois avec 10 mL de dichlorométhane, puis les phases organiques sont rassemblées, séchées avec MgSO<sub>4</sub> et évaporées sous pression réduite. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc avec un rendement de 91% (252 mg).



**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** δ(ppm/TMS) = 4,48 (m, 1H), 3,07 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H), 2,10 – 1,73 (m, 12 H), ppm.

Les autres authentiques étaient disponible commercialement.

### 3. Synthèse des polymères modifiés.

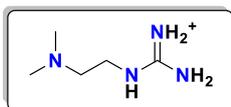
#### a) Synthèse des amines guanidylées pour les analyses par RMN <sup>1</sup>H

- Synthèse de la Amino((2-(diméthylamino)ethyl)amino)methaniminium :



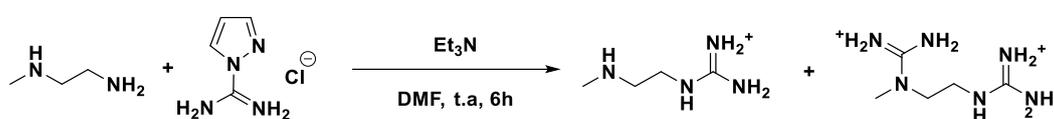
À une solution de 2-(diméthylamino)ethylamine (0,68 mmol, 1 eq.) dans le DMF (5mL), sont additionnés de la triéthylamine (4 eq., 378 µL) puis une solution de 1H-Pyrazole-1-carboximidine hydrochlorée (100 mg, 0,68 mmol, 1 eq.) dans le DMF (1 mL). Après 6 heures à température ambiante, la solution est évaporée à sec et caractérisée par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H.

**Amino((2-(diméthylamino)éthyl)amino)methaniminium :**



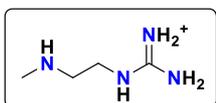
RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ(ppm/TMS) = 3,33 (t, J = 6,39 Hz, 2H), 2,59 (d, J = 6,39 Hz, 2H), 2,25 (s, 4H) ppm.

- Synthèse de la amino((2-(méthylamino)éthyl)amino)methaniminium et de la amino((2-((amino(iminio)méthyl)(méthyl)amino)éthyl)amino)methaniminium :



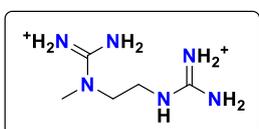
À une solution de 2-(méthylamino)éthylamine (0,68 mmol, 1 eq.) dans le DMF (5mL), sont additionnés de la triéthylamine (4 eq., 378 µL) puis une solution de 1H-Pyrazole-1-carboxamide hydrochlorée (100 mg, 0,68 mmol, 1 eq.) dans le DMF (1 mL). Après 6 heures à température ambiante, la solution est évaporée à sec et caractérisée par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H.

**amino((2-(méthylamino)éthyl)amino)methaniminium :**



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ(ppm/TMS) = 3,32 (t, J = 6,39 Hz, 2H), 2,77 (d, J = 6,39 Hz, 2H), 2,35 (s, 2H) ppm.

**amino((2-((amino(iminio)méthyl)(méthyl)amino)éthyl)amino)methaniminium :**



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ(ppm/TMS) = 3,67 (m, 4H), 2,91 (s, 4H) ppm.

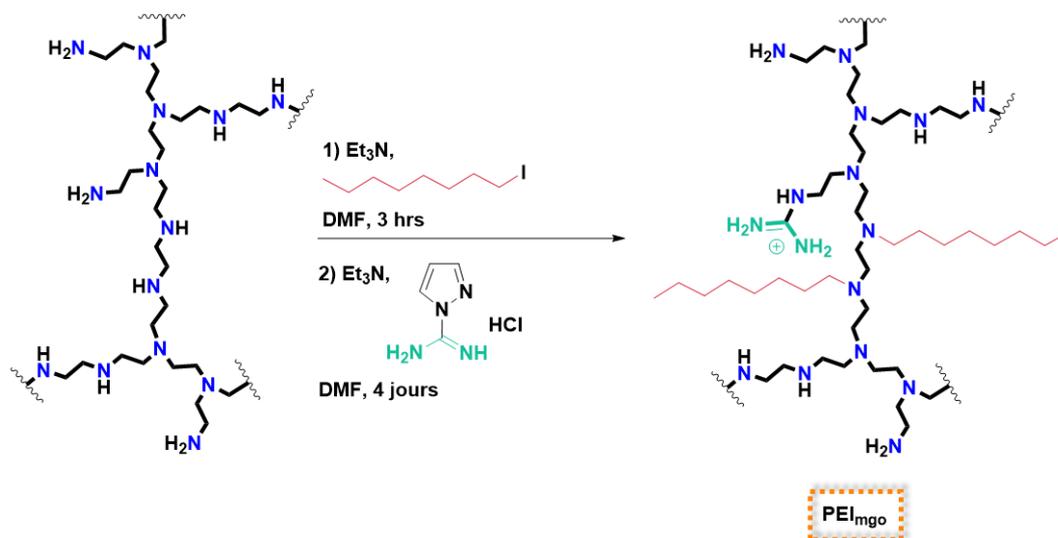
b) Synthèse des polymères bifonctionnalisés

Figure 144 : Schéma de synthèse pour un polymère bifonctionnalisé guanidinium-octyle ( $PEI_{mgo}$ ).

**Mode opératoire général :**

Le début de la synthèse est le même pour tous les polymères modifiés. Ils sont synthétisés dans des tubes Falcon de 50 mL à partir de polyéthylèneimine multibranché d'une taille moyenne de 25 kDa. Le polymère est solubilisé dans du DMF (10 mL) pour donner une concentration en  $PEI_{com}$  de  $17,2 \text{ mg.ml}^{-1}$  (400 mM en monomère). Ensuite, sont additionnés :

**- Dans le cas de la mono-fonctionnalisation par les groupements octyle :**

4 équivalents de triéthylamine par groupements octyle sont additionnés à la solution de  $PEI_{com}$  (10 mL à 400 mM en monomère) puis, l'iodooctane est ajouté goutte à goutte (0,2 à 2 équivalents par monomère). La solution est laissée 3 heures sous agitation à température ambiante. Il faut noter qu'à partir de 0,6 équivalent d'octyle ajoutés, le polymère modifié précipite et ne peut être resolubilisé. Il n'est donc pas possible de fonctionnaliser le  $PEI_{com}$  uniquement avec des groupements octyle au-delà de 0,6 équivalent par monomère.

**- Dans le cas de la mono-fonctionnalisation par les groupements guanidinium :**

4 équivalents de triéthylamine par groupement guanidinium sont additionnés à la solution de  $PEI_{com}$  (10 mL à 400 mM en monomère) puis une solution fraîchement préparée de chlorhydrate de 1-H-pyrazole-1-carboxamide dans le DMF (1 mL) est additionnée goutte à goutte (0,2 à 0,6

## *Partie expérimentale*

équivalent par monomère). Un précipité jaune (solide d'aspect chewing-gum) se forme après quelques heures et la solution est laissée sous agitation 4 jours à température ambiante.

### - Dans le cas de la mono-fonctionnalisation par les groupements naphthalène :

Pour la fonctionnalisation avec des groupements naphthalène, la concentration finale de la solution de  $\text{PEI}_{\text{com}}$  est de 200 mM dans un volume de 2 mL. 4 équivalents de triéthylamine par groupement naphthalène sont alors additionnés à la solution de  $\text{PEI}_{\text{com}}$  puis une solution fraîchement préparée de (S)-2,2-Bis(bromométhyl)-1,1-binaphthyl dans le DMF (1 mL) est additionnée goutte à goutte (0,1 à 0,2 équivalent par monomère). La solution est laissée sous agitation 4 jours à température ambiante. La solution est limpide durant le temps de la réaction.

### - Dans le cas de la bi-fonctionnalisation avec les groupements guanidinium et octyle :

Pour la fonctionnalisation avec des groupements guanidinium et octyle, on procède de la même manière que pour les mono-fonctionnalisations. Toutefois, le chlorhydrate de 1-H-pyrazole-1-carboxamide est ajouté après 3 heures de réaction avec l'iodooctane. Puis la solution est laissée sous agitation 4 jours à température ambiante. La solution est limpide de couleur jaune plus ou moins intense en fonction du nombre d'équivalents d'iodooctane ajoutés.

### - Dans le cas de la bi-fonctionnalisation avec les groupements guanidinium et naphthalène :

Pour la fonctionnalisation avec des groupements guanidinium et naphthalène, on procède de la même manière que pour les mono-fonctionnalisations. Toutefois, le chlorhydrate de 1-H-pyrazole-1-carboxamide est ajouté après 3 heures de réaction avec le (S)-2,2-Bis(bromométhyl)-1,1-binaphthyl. La solution est laissée sous agitation 4 jours à température ambiante. La solution devient turbide après ajout de la praxadine au milieu réactionnel.

### - Dans le cas de la tri-fonctionnalisation avec les groupements guanidinium, octyle et acide carboxylique :

Pour la fonctionnalisation avec les groupements guanidinium, octyle et carboxylate, on procède de la même manière que la fonctionnalisation seule. Toutefois, le chlorhydrate de 1-H-pyrazole-1-carboxamide est ajouté en dernier après 3 heures de réaction avec l'iodooctane, puis 24 h de réaction avec le carboxylate. La solution est laissée sous agitation 4 jours à température

ambiante. La solution est limpide de couleur jaune plus ou moins intense en fonction du nombre d'équivalents d'iodooctane ajoutés.

### **Traitement :**

Le traitement est identique pour tous les polymères modifiés. Après réaction, le milieu réactionnel est hydrolysé avec 10 mL d'une solution aqueuse de HCl (50 mM) et agité pendant 20 minutes. Durant cette étape, les précipités formés au cours de la réaction se dissolvent, excepté les polymères comportant une forte proportion de groupements octyle.

### **Purification :**

Les solutions résultantes sont transférées dans des membranes de dialyse (Spectra/Pore membrane, avec un « Cut-off » de 12000 – 14000 Da) pour ensuite être purifiées par dialyse sous faible agitation successivement dans chacune des solutions suivantes pendant au moins 2 heures : 20% EtOH dans HCl 50 mM ; HCl 50 mM ; eau distillé (x 2) ; NaOH 50 mM (x 2) et eau distillée (x 3). Après dialyse, la solution est replacée dans un tube Falcon, les volumes sont quantifiés et les concentrations en monomère des différents polymères modifiés sont estimées à partir du nombre de moles de polymère engagées et du volume final obtenu, puis mesurées par RMN <sup>1</sup>H.

### **Caractérisation par RMN du proton:**

2 mL de la solution obtenue après dialyse sont lyophilisés et le solide obtenu est dissous dans 600 µL de solvant deutéré (ethanol-d<sub>6</sub> ou D<sub>2</sub>O) puis analysé par RMN du proton.

Déplacements caractéristiques :

- Protons des méthylènes du squelette du PEI :  $\delta = 2,65$  (4H, CH<sub>2</sub>)
- Protons des méthylènes en position alpha des amines fonctionnalisés par un groupement guanidinium :  $\delta = 3,27$  (4H pour la substitution sur des amines secondaires ou 2 H dans le cas des amines primaires)
- Protons des chaînes Octyle :  $\delta = 2,46$  (2H, CH<sub>2</sub>), 1,50 (2H, CH<sub>2</sub>), 1,32 (10H, CH<sub>2</sub>), 0,91 (3H, CH<sub>3</sub>)

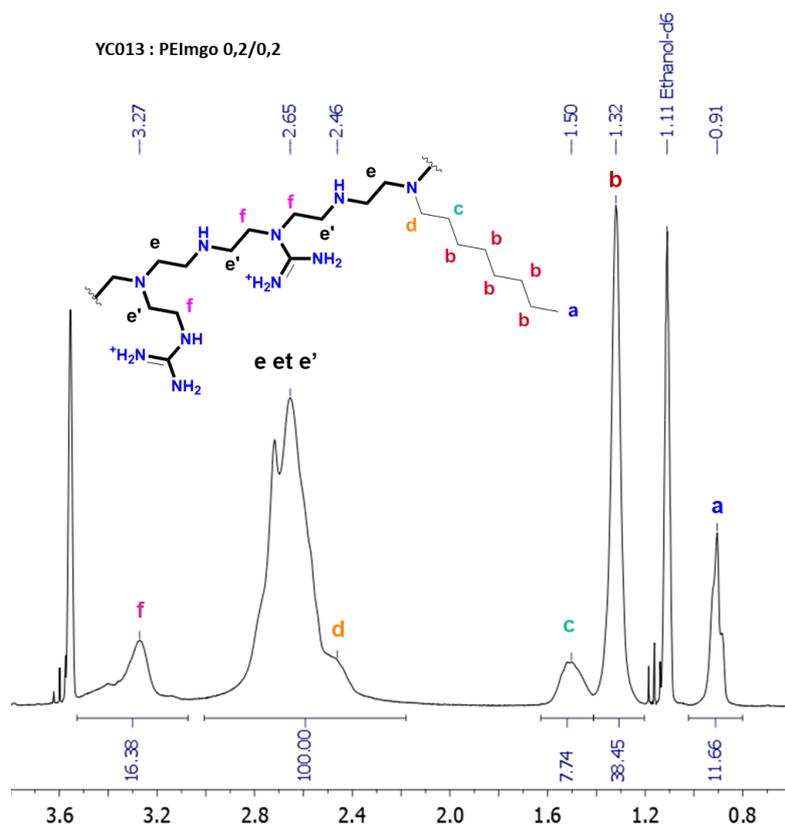
- Polymère bifonctionnalisé guanidinium-octyle:

Figure 145 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  dans l'éthanol  $\text{d}_6$  d'un polymère fonctionnalisé par des groupes guanidinium et octyle enregistré sur un spectromètre à 300 MHz.

Le taux de greffage des différents groupements a été estimé par RMN  $^1\text{H}$  selon le calcul suivant :

Dans le cas des protons des groupements octyle, l'aire des pics **a**, **b** et **c** correspondant à 15 protons permet de calculer l'aire correspondant à 1H :  $7,74/2 + 38,45/10 + 11,66/3 = 3,83$ . Ensuite, la valeur de l'aire des deux H du méthylène **d** ( $2 \times 3,83$ ) est retirée à l'aire du pic des protons **e** et **e'**. Cette valeur (**e** + **e'** - **d**) ajoutée à celle de **f** correspond à l'aire de la totalité des protons du squelette du polymère (**e**, **e'** et **f**). Concernant les protons **f**, deux types de substitutions par des groupements guanidinium sont possibles, soit sur les amines primaires, soit sur les amines secondaires. Si la substitution s'effectue sur les amines primaires, il y a un seul méthylène en position  $\alpha$  du groupement guanidinium, le signal correspondant intègre donc pour 2H (**f**, 2H). En revanche, sur les amines secondaires, deux méthylènes sont en  $\alpha$  du groupement guanidinium, le signal correspondant intègre donc pour quatre protons (**f**, 4H). De plus, le polymère commercial comprend 25% d'amines primaires

## Partie expérimentale

et 50 % d'amines secondaires. On peut donc considérer qu'il y a deux fois plus d'amines secondaires que d'amines primaires. Ainsi, on estime que les protons en  $\alpha$  d'un groupement guanidinium peuvent être attribués de la façon suivante : (**f**, 4H) pour 66% et (**f**, 2H) pour 33% ce qui donne une valeur moyenne pour **f** de 3,3H. Le nombre d'équivalents de chaque substituant est donc déterminé grâce au rapport de la valeur de l'aire correspondant à 1 H pour chaque substituant sur la valeur de l'aire correspondant à 1 H pour la totalité des protons du polymère Enfin, la détermination de la concentration est réalisée à l'aide de la masse obtenue après lyophilisation. En ce qui concerne la masse molaire du polymère, on utilise celle du monomère à laquelle on ajoute la masse molaire de chaque substituant multiplié par leur nombre d'équivalents calculé précédemment.

### Protons du groupement octyle (a, b et c):

- Proton **c** :  $7,74/2 = 3,87$
- Proton **b** :  $38,45/10 = 3,84$
- Proton **a** :  $11,66/3 = 3,88$

$$3,83 / 1H$$

### Protons du polymère (e et e'):

$$(e + e') - 2 \times d$$

$$100 - 2 \times 3,83 = 92,34 / 4H$$

$$23,08 / 1H$$

### Protons en alpha d'une fonction Guanidinium (f) :

$$16,38 / 3,3 H$$

$$4,96 / 1H$$

### Equivalents d'octyle:

Détermination du nombre d'équivalents:

$$\frac{3,83}{28,04} = 0,14 \text{ équivalent}$$

### Equivalents de guanidinium:

$$\frac{4,96}{28,04} = 0,18 \text{ équivalent}$$

Détermination de la concentration [c]:

Volume lyophilisé : 17 mL  
Masse obtenu : 106 mg

$$n = \frac{106 \times 10^{-3}}{(43 + 0,18 \times 44 + 0,14 \times 112)} = 1,59 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

$$[c] = \frac{1,59 \times 10^{-3}}{17 \times 10^{-3}} = 94 \text{ mM}$$

**Figure 146 : Détail des calculs pour déterminer le nombre d'équivalents en groupement octyle et guanidinium greffés ainsi que la concentration d'un polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium et octyle.**

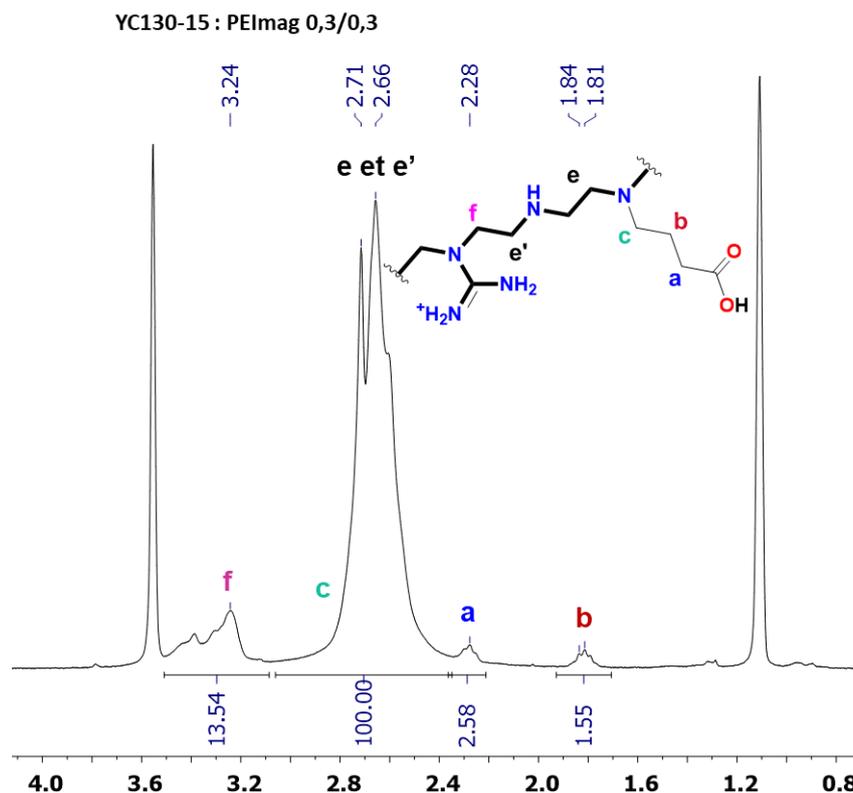
- Polymère bifonctionnelisé acide-guanidinium:

Figure 147 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 300 MHz dans l'éthanol  $d_6$  d'un polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium et acide carboxylique (acide 4-bromobutanoïque).

Dans le cas des protons des groupements acide butanoïque, l'aire des pics **a** et **b** correspondant à 4 protons permet de calculer la valeur de l'aire correspondant à 1H ( $2,85/2 + 1,55/2 = 1,03$ ). Ensuite, la valeur de l'aire correspondant aux deux H du méthylène **c** ( $2 \times 1,03$ ) est retirée à l'aire du pic des protons **e** et **e'**. Cette valeur (**e + e' - d**) ajoutée à celle de **f** correspond à l'aire de la totalité des protons du squelette du polymère (**e**, **e'** et **f**). Le nombre d'équivalents de chaque substituant est donc déterminé grâce au rapport de la valeur de l'aire correspondant à 1 H pour chaque substituant sur la valeur de l'aire correspondant à 1 H pour la totalité des protons du polymère. Enfin, la détermination de la concentration est réalisée à l'aide de la masse obtenue après lyophilisation. En ce qui concerne la masse molaire du polymère, on utilise celle du monomère à laquelle on ajoute la masse molaire de chaque substituant multiplié par leur nombre d'équivalents calculé précédemment.

## Partie expérimentale

### Protons du groupement acide (a et b) :

- Proton **a** :  $2,58/2 = 3,88$
- Proton **b** :  $1,55/2 = 3,84$

$$1,03 / 1H$$

### Protons du polymère (e et e') :

$$(e + e') - 2 \times c$$

$$100 - 2 \times 1,03 = 97,94 / 4H$$

$$24,49 / 1H$$

### Protons en alpha d'une fonction Guanidinium (f) :

$$13,54 / 3,3 H$$

$$4,1 / 1H$$

### Equivalents d'acide :

Détermination du nombre d'équivalents :

$$\frac{1,03}{28,59} = 0,04 \text{ équivalent}$$

### Equivalents de guanidinium :

$$\frac{4,1}{28,59} = 0,14 \text{ équivalent}$$

Détermination de la concentration [c] :

Volume lyophilisé : 2 mL  
Masse obtenu : 6,9 mg

$$n = \frac{6,9 \times 10^{-3}}{(43 + 0,14 \times 44 + 0,04 \times 87)} = 1,31 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

$$[c] = \frac{1,31 \times 10^{-4}}{2 \times 10^{-3}} = 65 \text{ mM}$$

**Figure 148 : Détail des calculs pour déterminer le nombre d'équivalent en groupement acide et guanidinium greffés ainsi que la concentration d'un polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium et acide carboxylique (acide 4-bromobutanoïque).**

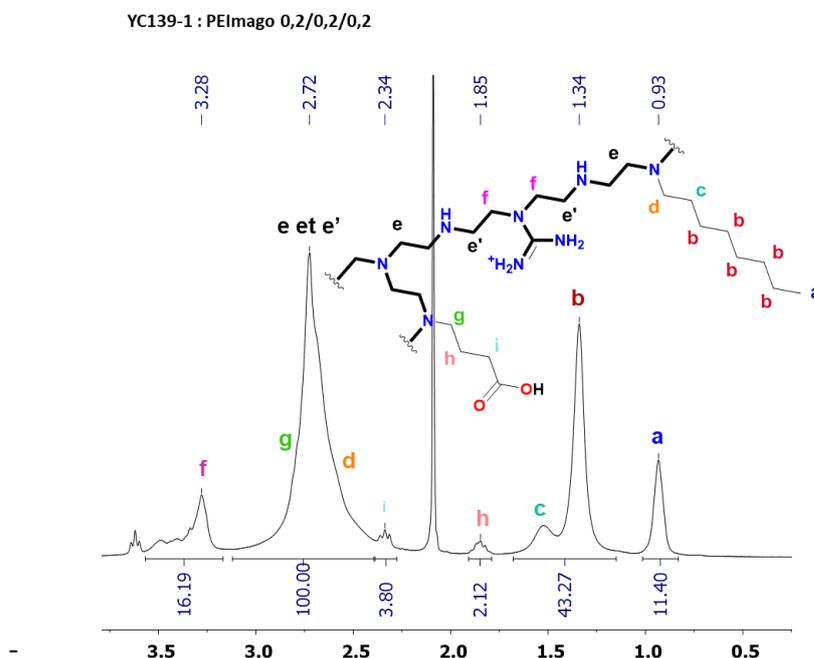
- Polymère tri-fonctionnalisé acide-guanidinium-octyle:

Figure 149 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  à 300 MHz dans l'eau deutérée d'un polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium, acide carboxylique (acide 4-bromobutanoïque) et octyle.

Dans le cas des protons des groupements octyle, l'aire des pics **a**, **b** et **c** correspondant à 15 protons permet de calculer la valeur de l'aire correspondant à 1H ( $43,27/12 + 11,40/3 = 3,3,7$ ). Ensuite, la valeur de l'aire correspondant aux deux H du méthylène **d** ( $2 \times 3,7$ ) est retirée à l'aire du pic des protons **e** et **e'**. Dans le cas des protons des groupements acide, l'aire des pics **h** et **i** correspondant à 4 protons permet de calculer la valeur de l'aire correspondant à 1H ( $3,80/2 + 2,12/2 = 1,48$ ). Ensuite, la valeur de l'aire correspondant aux deux H du méthylène **g** ( $2 \times 1,48$ ) est retirée à l'aire du pic des protons **e** et **e'**. Cette valeur ( $e + e' - d - g$ ) ajoutée à celle de **f** correspond à la totalité des protons du squelette du polymère (**e**, **e'** et **f**). Le nombre d'équivalents de chaque substituant est donc déterminé grâce au rapport de la valeur pour 1 H de chaque substituant sur la valeur de l'aire correspondant à 1 H pour la totalité des protons du polymère. Enfin, la détermination de la concentration est réalisée à l'aide de la masse obtenue après lyophilisation. En ce qui concerne la masse molaire du polymère, on utilise celle du monomère à laquelle on ajoute la masse molaire de chaque substituant multiplié par leur nombre d'équivalents calculé précédemment.

## Partie expérimentale

### Protons du groupement octyle (a, b et c):

- Proton **b et c**:  $43,27/12 = 3,6$
- Proton **a**:  $11,40/3 = 3,8$

$$3,7 / 1H$$

### Protons du polymère (e et e'):

$$(e + e') - 2 \times d - 2 \times g$$

$$100 - 2 \times 3,7 - 2 \times 1,48 = 89,64 / 4H$$

$$22,41 / 1H$$

### Protons en alpha d'une fonction Guanidinium (f):

$$16,19 / 3,3 H$$

$$4,9 / 1H$$

### Protons du groupement acide (i et h):

- Proton **i**:  $3,80/2 = 1,9$
- Proton **h**:  $2,12/2 = 1,06$

$$1,48 / 1H$$

### Equivalents d'octyle:

Détermination du nombre d'équivalents :

$$\frac{3,7}{27,31} = 0,14 \text{ équivalent}$$

### Equivalents d'acide:

$$\frac{1,48}{27,31} = 0,05 \text{ équivalent}$$

### Equivalents de guanidinium:

$$\frac{4,9}{27,31} = 0,18 \text{ équivalent}$$

Détermination de la concentration [c]:

Volume lyophilisé : 2 mL

Masse obtenu : 12,6 mg

$$n = \frac{12,6 \times 10^{-3}}{(43 + 0,18 \times 44 + 0,14 \times 112 + 0,05 \times 87)} = 1,78 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

$$[c] = \frac{1,78 \times 10^{-3}}{2 \times 10^{-3}} = 89 \text{ mM}$$

**Figure 150 : Détail des calculs pour déterminer le nombre d'équivalents en groupements acide, octyle et guanidinium greffés ainsi que la concentration d'un polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium, acide carboxylique (acide 4-bromobutanoïque) et octyle.**

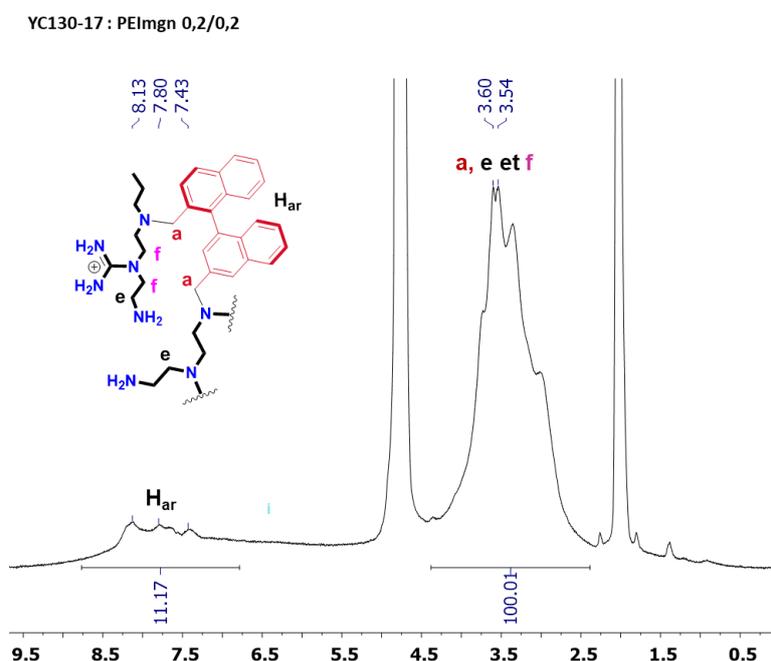
- Polymère bifonctionné guanidinium-naphtalène:

Figure 151 : Spectre RMN  $^1H$  à 300 MHz dans l'eau deutérée d'un polymère fonctionné par des groupements guanidinium et bi-naphtyle.

Dans le cas des protons des groupements naphthalène, l'aire du pic **Har** correspondant à 10 protons permet de calculer la valeur de l'aire correspondant à 1H ( $11,17/10 = 1,12$ ). Ensuite, la valeur de l'aire correspondant aux quatre H du méthylène **a** ( $4 \times 1,12$ ) est retirée à l'aire du pic des protons **e**, **e'** et **f**. Cette valeur (**e + e' - f - a**) correspond à la totalité des protons du squelette du polymère (**e**, **e'** et **f**). Le nombre d'équivalents de naphthalène greffé est donc déterminé grâce au rapport de la valeur de l'aire correspondant à 1 H du naphthalène sur la valeur de l'aire correspondant à 1 H pour la totalité des protons du polymère.

## Partie expérimentale

### Protons du groupement naphthalène (Har):

- Proton Har: 11,17/10H

$$1,12 / 1H$$

### Protons du polymère (e et e'):

$$(e + e' + f) - 4 \times a$$

$$100 - 4 \times 1,12 = 95,5 / 4H$$

$$23,87 / 1H$$

### Equivalents de naphthalène:

Détermination du  
nombre d'équivalents :

$$\frac{1,12}{23,87} = 0,05 \text{ équivalent}$$

Figure 152 : Détail des calculs pour déterminer le nombre d'équivalents en groupements acide, octyle et guanidinium greffés ainsi que la concentration d'un polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium et bi-naphtyle.

## III. Caractérisation et réactivité de l'enzyme artificielle FMN-PEIm

### 1. Incorporation de la FMN dans le polymère.

Différentes solutions aqueuses sont préparées dans des cuves UV-visible en quartz (2 mL) et les spectres sont enregistrés entre 300 et 550 nm :

- FMN (50  $\mu$ M)
- FMN (50  $\mu$ M) – Polymère (10 mM)
- FMN (50  $\mu$ M) – Polymère (10 mM) – Substrat (1-10-125 mM)

### 2. Suivi de l'oxydation du NADH par spectroscopie UV-visible

Pour l'oxydation de NADH, 920  $\mu$ L de solution aqueuse de FMN (2  $\mu$ M) et de polymère modifié (2 mM en monomère) sont préparés directement dans une cuve UV-visible. Une solution aqueuse de NADH (5 mM) est préparée en parallèle. Le suivi de la cinétique d'oxydation de NADH est ensuite effectué à 20°C, après addition de NADH (80  $\mu$ L, 200 équivalents, concentration finale 400  $\mu$ M), en enregistrant les variations de son absorbance à 340 nm en fonction du temps. Les points sont enregistrés toutes les minutes pendant 12 heures.

### 3. Suivi de l'oxydation de l'ascorbate de sodium par spectroscopie UV-visible

Pour l'oxydation de l'ascorbate de sodium, 920  $\mu$ L de solution aqueuse de FMN (0,5  $\mu$ M) et de polymère modifié (0,5 mM en monomère) sont préparés dans une cuve UV-visible. Une solution

aqueuse de d'ascorbate de sodium (5 mM) est préparée en parallèle. Le suivi de la cinétique d'oxydation de l'ascorbate de sodium est ensuite effectué à 20 °C, après addition de l'ascorbate de sodium (20 µL, 20 équivalents, concentration finale 100 µM) en enregistrant les variations de son absorbance à 265 nm. Les points sont enregistrés toutes les minutes pendant 12 heures.

#### 4. Suivi de la réduction de la FMN par NADH ou l'ascorbate par spectroscopie UV-visible

Pour la réduction de la FMN par un réducteur (NADH ou ascorbate de sodium) sous atmosphère inerte, 2 mL de solution aqueuse de FMN (25 µM) et de polymère modifié PEI<sub>ref</sub> (2,5 mM) sont préparés dans une cuve UV-visible. Parallèlement, une solution aqueuse de réducteur (NADH ou Ascorbate de sodium) (12,5 mM) est préparée. Les deux solutions sont dégazées durant deux heures. La réaction est initiée par injection du réducteur (40 µL, 10 équivalents, concentration finale 250 µM) à travers le septum qui recouvre la cuve. La même expérience est réalisée sans polymère. La cinétique de réduction de la FMN est suivie à 20 °C sous atmosphère d'argon en enregistrant les variations de l'absorbance entre 250 et 800 nm en fonction du temps. Un spectre est enregistré toutes les minutes pendant les 60 premières minutes puis toutes les 10 minutes.

#### 5. Suivi de la réduction de la FMN par l'ascorbate de sodium par fluorescence

Les expériences de fluorescence sont réalisées dans une plaque 96 puits à fond noir. 90 µL de solution aqueuse de FMN (100 µM) et de polymère modifié PEI<sub>ref</sub> (2 mM) sont versés dans chaque puits. Parallèlement une solution aqueuse d'ascorbate de sodium (10 mM) est préparée. La cinétique est initiée par injection de 10 µL d'ascorbate de sodium (concentration finale 1 mM) dans chaque puits pour un volume final de 100 µL. La même réaction est réalisée en absence de polymère ou en remplaçant l'ascorbate de sodium par le NADH. Les spectres sont enregistrés à une longueur d'onde d'excitation de 614 nm avec 25 flashes, un temps de mesure de 20 µs, un temps de latence avant la mesure de 8 µs et un temps de repos après la mesure de 2 ms. Le maximum d'émission est mesuré à 686 nm. Une valeur est enregistrée toutes les 5 minutes pendant 12 heures.

## 6. Suivi de la régénération de NADH par spectroscopie UV-visible

Pour ces expériences, les concentrations des solutions d'enzymes naturelles sont déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre ThermoFischer Nanodrop 2000 en mesurant l'absorbance à 280 nm.

- *Réduction de NAD<sup>+</sup> par le complexe d'iridium [Cp\*Ir(H-bpy)Cl]Cl :*

900 µL de solution aqueuse de [Cp\*Ir(H-bpy)Cl]Cl (50 µM) et de formiate de sodium (50 mM) sont préparés dans une cuve UV-visible. Parallèlement, une solution aqueuse de NAD<sup>+</sup> (5 mM) est préparée. La cinétique est initiée par injection de 100 µL de solution de NAD<sup>+</sup> (concentration finale 500 µM). La même expérience est réalisée en présence de **PEI<sub>ref</sub>** (2,5 mM). La cinétique de réduction de NAD<sup>+</sup> est suivie à 20 °C en enregistrant les variations de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps. Un spectre est enregistré toutes les minutes pendant 15 heures.

- *Réduction de NAD<sup>+</sup> par la formiate déshydrogénase (FDH) :*

920 µL de solution aqueuse de FDH (200 nM) et de formiate de sodium (150 mM) sont préparés dans une cuve UV-visible. Parallèlement, une solution aqueuse de NAD<sup>+</sup> (5 mM) est préparée. La cinétique est initiée par injection de 80 µL de solution de NAD<sup>+</sup> (concentration finale 400 µM). La même expérience est réalisée en présence de **PEI<sub>ref</sub>** (5 mM). La cinétique de réduction de NAD<sup>+</sup> est suivie à 20 °C en enregistrant les variations de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps. Les points sont enregistrés toutes les minutes pendant 5 heures.

- *Réduction de NAD<sup>+</sup> par l'alcool déshydrogénase (ADH) :*

920 µL de solution aqueuse d'ADH (200 nM) et d'alcool (cyclobutanol, isopropanol ou éthanol) (150 mM) est préparés dans une cuve UV-visible. Parallèlement, une solution aqueuse de NAD<sup>+</sup> (5 mM) est préparée. La cinétique est initiée par injection 80 µL de solution de NAD<sup>+</sup> (concentration finale 400 µM). La même expérience est réalisée en présence de **PEI<sub>ref</sub>** (5 mM). La cinétique de réduction de NAD<sup>+</sup> est suivie à 20 °C en enregistrant les variations de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps. Les points sont enregistrés toutes les minutes pendant 5 heures

## 7. Mise en évidence du radical semiquinone par RPE

Deux millilitres de solution aqueuse de FMN (1 mM) et de polymère modifié **PEI<sub>ref</sub>** (5 mM) sont préparés dans un Schlenk. Parallèlement, 1 mL d'une solution aqueuse d'ascorbate de sodium (10

mM) est également préparée dans un Schlenk. Les deux solutions sont dégazées par des cycles de congélation-décongélation sous vide. La solution d'ascorbate est ensuite canulée vers la solution de FMN (volume total 3 mL) et le mélange réactionnel est agité à l'abri de la lumière durant 10 h.

Après ce temps, pour la mise en évidence de la formation du radical semiquinone en solution, 100  $\mu$ L de la solution finale sont canulés dans un tube RPE préalablement dégazé, qui est ensuite plongé dans un bain d'éthanol à  $\sim 173$  K (éthanol refroidi dans de l'azote liquide) puis transféré dans l'azote liquide et refroidi à 77 K, avant d'être introduit dans le spectromètre RPE. Les contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions.

Pour les mesures réalisées sur le solide, la solution finale est évaporée à sec et le solide est transféré dans un tube RPE préalablement dégazé qui est ensuite plongé dans un bain d'éthanol à  $\sim 173$  K (éthanol refroidi dans de l'azote liquide) puis transféré dans l'azote liquide et refroidi à 77 K avant d'être introduit dans le spectromètre RPE. Les contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions.

### 8. Mise en évidence du radical phényle par RPE

1,5 mL de solution aqueuse de FMN (1 mM), de polymère modifié **PEI<sub>ref</sub>** (5 mM), de PBN (1 mM), et de sel d'iodonium Ph<sub>2</sub>IOTf (1 mM) sont préparés dans un Schlenk. Parallèlement, 1 mL d'une solution d'ascorbate de sodium (1 mM) est également préparée dans un Schlenk. Les deux solutions sont dégazées par des cycles de congélation-décongélation sous vide. Ensuite, la solution d'ascorbate est canulée vers la solution de FMN (volume total 2,5 mL) et le mélange réactionnel est agité à l'abri de la lumière durant 4 h. Après ce temps, 50  $\mu$ L de solution sont transférés dans un capillaire puis dans un tube RPE qui est ensuite introduit dans le spectromètre RPE à température ambiante. Les contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions.

### 9. Mesure de la concentration en peroxyde d'hydrogène

Les mesures de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été effectuées dans des flacons ambrés de 1,5 mL. A 920  $\mu$ L d'une solution aqueuse de FMN (5  $\mu$ M), de substrat (10 mM) et de PEI (5 mM) sont ajoutés 80  $\mu$ L d'une solution aqueuse de réducteur, NADH ou ascorbate de sodium, 25 mM (200 équivalents, concentration finale 1 mM) pour obtenir un volume final de 1 mL. Le mélange est agité

à température ambiante et sous pression atmosphérique. Des languettes de mesure sensibles au peroxyde d'hydrogène (Quantofix®) sont plongées directement dans la solution aqueuse pour mesurer sa concentration (0,5 mg/L – 25 mg/L ou 0,015 mM – 0,75 mM). Les contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions. La concentration maximale pouvant être atteinte est de 1 mM avec ces conditions réactionnelles.

#### IV. Catalyse des réactions d'oxydation

##### 1. Catalyse par le système PEIm-FMN-NADH :

Les expériences ont été effectuées dans des flacons ambrés de 1,5 mL. A 920 µL d'une solution aqueuse de FMN (5 µM), de substrat (10 mM) et de PEI (5 mM) sont ajoutés 80 µL d'une solution aqueuse de NADH 25 mM (200 équivalents, concentration finale 1 mM) pour obtenir un volume final de 1 mL. Le mélange est laissé sous agitation pendant 10 h (bouchon fermé) à température ambiante et sous pression atmosphérique. Les contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions.

##### 2. Catalyse par le système PEIm-FMN-Ascorbate de sodium :

Les expériences ont été effectuées dans des flacons ambrés de 1,5 mL. A 920 µL d'une solution aqueuse de FMN (5 µM), de substrat (10 mM) et de PEI (5 mM) sont ajoutés 80 µL d'une solution aqueuse d'ascorbate de sodium 25 mM (200 équivalents, concentration finale 1 mM) pour obtenir un volume final de 1 mL. Le mélange est laissé sous agitation pendant 48 h (bouchon fermé) à température ambiante et pression atmosphérique. Les contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions.

##### 3. Catalyse par le système PEIm-FMN-ADH-alcool-NAD<sup>+</sup> :

Les expériences ont été effectuées dans des flacons ambrés de 1,5 mL. A 920 µL d'une solution aqueuse de FMN (5 µM), de substrat (10 mM), de PEI (5 mM), d'ADH (200 nM) et d'alcool (cyclobutanol, isopropanol) (10 mM) sont ajoutés 80 µL d'une solution aqueuse de NAD<sup>+</sup> 25 mM (200 équivalents, concentration finale 1 mM) pour obtenir un volume final de 1 mL. Le mélange est laissé sous agitation pendant 5 jours (bouchon fermé) à température ambiante et sous pression atmosphérique. Les contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions.

#### 4. Catalyse par le système PEIm-FMN-FDH-formiate d'ammonium-NAD<sup>+</sup> :

Les expériences ont été effectuées dans des flacons ambrés de 1,5 mL. A 920 µL d'une solution aqueuse de FMN (100 µM), de substrat (10 mM), de PEI (5 mM), de FDH (500 nM) et de HCOONH<sub>4</sub> (500 mM) sont ajoutés 80 µL d'une solution de NAD<sup>+</sup> 25 mM (200 équivalents, concentration finale 1 mM) pour obtenir un volume final de 1 mL. Le mélange est laissé sous agitation pendant 5 jours (bouchon fermé) à température ambiante et sous pression atmosphérique. Les contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions.

Informations complémentaires :

- Problème d'évaporation de certains substrats si le flacon n'est pas fermé
- Pas d'amélioration de rendement si la solution est pré-saturée en dioxygène
- Pas d'amélioration de rendement si la solution est sous surpression de dioxygène

#### 5. Analyse par GC des mélanges réactionnels après catalyse

Le traitement est identique pour toutes les solutions. Pour les analyses par GC, 40 µL d'une solution d'acétophénone (utilisée comme standard) 50 mM dans ACN sont ajoutés au mélange réactionnel (concentration finale 2 mM). 8 mL d'ACN sont par la suite ajoutés et le mélange obtenu est séché avec Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 g). 1 mL de cette solution est ensuite filtrée sur silice (1 cm dans une pipette pasteur). Enfin, 3 µL de filtrat sont injectés sur une colonne Zebron ZB Semi Volatiles (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), ou sur une colonne Hydrodex g\_DiMOM (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm) pour l'analyse de la chiralité des produits. Selon le substrat utilisé, les conditions suivantes ont été utilisées :

**Bicylo[3.2.0]hept-2-en-6-one** : gradient de température de 100 °C à 130 °C à 5 °C/min, puis de 130 °C à 220 °C à 50 °C/min, puis palier de 4 minutes 220°C. Température de l'injecteur et du FID : 300 °C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : Bicylo[3.2.0]hept-2-en-6-one (2,82), acétophénone (3,99), **lactone 2** (5,71) et **lactone 1** (5,78).

**Bicylo[3.2.0]hept-2-en-6-one (chiral)** : gradient de température de 110 °C à 130 °C à 5 °C/min, puis palier de 13 min à 130 °C, puis gradient de température de 130 °C à 170 °C à 8°C/min et enfin palier de 1 minute à 170 °C. Température de l'injecteur et du FID : 300 °C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : Bicylo[3.2.0]hept-2-en-6-one (4,35), Bicylo[3.2.0]hept-2-

## Partie expérimentale

en-6-one' (4,63), acétophénone (5,60), **lactone 2** (14,37), **lactone 1** (15,57), **lactone 1'** (16,54) et **lactone 2'** (16,92).

**Thioanisole, dithiane, adamantanone, benzyl-méthyl-thioéther** : gradient de température de 100 °C à 130 °C à 5 °C/min, puis de 130 °C à 220 °C, à 50 °C/min, et palier de 4 minutes à 220 °C. Température de l'injecteur et du FID : 300 °C. Etalon interne : acétophénone (3,99).

**Thioanisole** : Temps de rétention (min) : thioanisole (4,32), méthyl-phényle sulfoxyde (7,56), méthyl-phényle sulfone (8,04).

**Dithiane** : Temps de rétention (min) : dithiane (4,64), 1,3-dithiane 1-oxyde (8,58).

**Adamantanone** : Temps de rétention (min) : Adamantanone (7,52), 4-Oxatricyclo[4.3.1.1~3,8~]undecan-5-one (9,78).

**Benzyl-méthyl-thioéther** : Temps de rétention (min) : benzyl-méthyle thioéther (5,11), benzyl-méthyle sulfoxyde (8,69), benzyl-méthyle sulfone (9,00).

**3-Phényl-cyclobutanone** : gradient de température de 100 °C à 220 °C à 20 °C/min, puis palier de 2 minutes à 220 °C. Température de l'injecteur et du FID : 300 °C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : acétophénone (3,02), 3-Phényle cyclobutanone (4,58), 3-Phényl-gamma-butyrolactone (6,18).

**Cyclobutanone** : gradient de température de 50 °C à 54 °C à 1°C/min, puis de 54 °C à 150 °C à 15 °C/min °C, et de 150 °C à 220 °C à 50 °C/min, puis finalement palier de 1 minute à 220 °C. Température de l'injecteur et du FID : 300 °C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : cyclobutanone (2,28), gamma-butyrolactone (6,28), acétophénone (9,95).

**Tert-butyl- méthyl-thioéther** : gradient de température de 50 °C à 100 °C à 5°C/min, puis de 80 °C à 220 °C à 50 °C/min °C, et palier de 3 minutes à 220 °C. Température de l'injecteur et du FID : 300 °C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : tert-butyl-méthyle thioéther (2,62), tert-butyl-méthyle sulfoxyde (7,27), acétophénone (9,78).

**Diisopropyle thioéther** : gradient de température de 50 °C à 80 °C à 5 °C/min, puis de 80 °C à 220 °C à 50 °C/min °C, et palier de 3 minutes à 220 °C. Température de l'injecteur et du FID : 300 °C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : diisopropyle thioéther (3,45), acétophénone (7,85), diisopropyle sulfoxyde (8,69).

## Partie expérimentale

**Cyclopentanone** : gradient de température de 100 °C à 118 °C à 3°C/min, puis de 118 °C à 220 °C, 50 °C/min, palier de 2 minutes à 220 °C. Température de l'injecteur et du FID : 300 °C. Etalon interne : acétophénone. Temps de rétention (min) : acétophénone (4,20), Cyclopentanone (2,09), Valerolactone (4,12).

Le Tableau 23 regroupe les coefficients directeurs des différentes droites d'étalonnage établies à partir de l'analyse par GC des différents composés standard, en vue de l'analyse quantitative des différents échantillons obtenus lors des expériences de catalyse d'oxydation effectuées.

La concentration des différents composés obtenus lors des différentes réactions d'oxydation a été quantifiée d'après l'équation suivante :

$$[\text{composé } X] = [\text{standard}] \times \frac{\text{Aire composé } X}{\text{Aire standard}} \times \frac{a \text{ standard}}{a \text{ composé } X}$$

Avec Aire : l'aire du pic associé au composé sur le chromatogramme

a : coefficient directeur

[composé] : concentration du composé

Partie expérimentale

Tableau 23 Coefficients directeurs des droites d'étalonnage réalisés par chromatographie en phase gazeuse des différents composés utilisés lors des études de catalyse d'oxydation.

Composés	Coefficient directeur de la droite d'étalonnage
Acétophénone	$1,88697 \times 10^{13}$
Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one	$1,35491 \times 10^{13}$
lactone 1	$1,46253 \times 10^{13}$
lactone 2	$1,46645 \times 10^{13}$
Cyclobutanone	$1,21053 \times 10^{13}$
Butyrolactone	$7,77500 \times 10^{12}$
3-phényle cyclobutanone	$2,04921 \times 10^{13}$
3-Phényl-gamma-butyrolactone	$2,73801 \times 10^{13}$
Thioanisole	$1,90799 \times 10^{13}$
Méthyl-phényle sulfoxyde	$1,97849 \times 10^{13}$
Dithiane	$2,08509 \times 10^{13}$
1,3-dithiane 1-oxyde	$9,48712 \times 10^{12}$
Benzyl-méthyle thioéther	$4,41342 \times 10^{13}$
Benzyl-méthyle sulfoxyde	$6,17230 \times 10^{13}$
benzyl-méthyle sulfone	$2,9002 \times 10^{13}$

**Bibliographie**

- [1] P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, **1998**.
- [2] I. Hermans, E. S. Spier, U. Neuenschwander, N. Turrà, A. Baiker, *Top. Catal.* **2009**, *52*, 1162–1174.
- [4] E. Romero, J. R. Gómez Castellanos, G. Gadda, M. W. Fraaije, A. Mattevi, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 1742–1769.
- [5] B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947–3980.
- [6] Y. Roux, R. Ricoux, F. Avenier, J.-P. Mahy, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8509.
- [7] E. Romero, J. R. Gómez Castellanos, G. Gadda, M. W. Fraaije, A. Mattevi, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 1742–1769.
- [8] S. Ghisla, D. E. Edmondson, in *Encycl. Life Sci.* (Ed.: John Wiley & Sons, Ltd), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2009**.
- [9] F. Müller, *Free Radic. Biol. Med.* **1987**, *3*, 215–230.
- [10] S. Ghisla, D. E. Edmondson, in *Encycl. Life Sci.* (Ed.: John Wiley & Sons, Ltd), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2009**.
- [11] P. Hemmerich, V. Massey, *FEBS Lett.* **1977**, *84*, 5–21.
- [12] S. G. Mayhew, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *265*, 698–702.
- [13] C. A. Brautigam, B. S. Smith, Z. Ma, M. Palnitkar, D. R. Tomchick, M. Machius, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 12142–12147.
- [14] P. Macheroux, in *Flavoprotein Protoc.*, Humana Press, New Jersey, **1999**, pp. 1–8.
- [15] G. Weber, *Biochem. J.* **1950**, *47*, 114–121.
- [16] A. Bowd, P. Byrom, J. B. Hudson, J. H. Turnbull, *Photochem. Photobiol.* **1968**, *8*, 1–10.
- [17] D. Su, M. P. Kabir, Y. Orozco-Gonzalez, S. Gozem, G. Gadda, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1646–1652.
- [18] Y.-T. Kao, C. Tan, S.-H. Song, N. Öztürk, J. Li, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7695–7701.
- [19] Y.-T. Kao, C. Saxena, T.-F. He, L. Guo, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13132–13139.
- [20] S. Chapman, C. Faulkner, E. Kaiserli, C. Garcia-Mata, E. I. Savenkov, A. G. Roberts, K. J. Oparka, J. M. Christie, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 20038–20043.
- [21] A. Mukherjee, J. Walker, K. B. Weyant, C. M. Schroeder, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e64753.
- [22] S. Gozem, E. Mirzakulova, I. Schapiro, F. Melaccio, K. D. Glusac, M. Olivucci, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9870–9875.
- [23] R.-K. Zhao, A. Lukacs, A. Haigney, R. Brust, G. M. Greetham, M. Towrie, P. J. Tonge, S. R. Meech, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 17642.
- [24] G. Gadda, *Biochemistry* **2012**, *51*, 2662–2669.
- [25] V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22459–22462.
- [26] C. Kemal, T. W. Chan, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7272–7286.
- [27] A. Pennati, G. Gadda, *Biochemistry* **2011**, *50*, 1–3.
- [28] D. Ouedraogo, J. Ball, A. Iyer, R. A. G. Reis, M. Vodovoz, G. Gadda, *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *632*, 192–201.
- [29] A. Mattevi, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 276–283.
- [30] H. Leisch, K. Morley, P. C. K. Lau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165–4222.
- [31] J. Sucharitakul, R. Tinikul, P. Chaiyen, *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *555–556*, 33–46.
- [32] M. M. E. Huijbers, S. Montersino, A. H. Westphal, D. Tischler, W. J. H. van Berkel, *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *544*, 2–17.
- [33] B. Entsch, W. J. van Berkel, *FASEB J.* **1995**, *9*, 476–483.
- [34] K. Crozier-Reabe, G. Moran, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 15601–15639.

## Bibliographie

- [35] A. Baeyer, V. Villiger, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, *32*, 3625–3633.
- [36] M. Renz, B. Meunier, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *1999*, 737–750.
- [37] R. Criegee, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1948**, *560*, 127–135.
- [38] G. E. Turfitt, *Biochem. J.* **1948**, *42*, 376–383.
- [39] J. Fried, R. W. Thoma, A. Klingsberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 5764–5765.
- [40] A. Willetts, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 55–62.
- [41] C. C. Ryerson, D. P. Ballou, C. Walsh, *Biochemistry* **1982**, *21*, 2644–2655.
- [42] D. Sheng, D. P. Ballou, V. Massey, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11156–11167.
- [43] R. Teufel, F. Stull, M. J. Meehan, Q. Michaudel, P. C. Dorrestein, B. Palfey, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8078–8085.
- [44] R. Teufel, A. Miyanaga, Q. Michaudel, F. Stull, G. Louie, J. P. Noel, P. S. Baran, B. Palfey, B. S. Moore, *Nature* **2013**, *503*, 552–556.
- [45] W. Duane, J. W. Hastings, *Mol. Cell. Biochem.* **1975**, *6*, 53–64.
- [46] F. Fieschi, V. Nivière, C. Frier, J.-L. Décout, M. Fontecave, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30392–30400.
- [47] P. Gaudu, D. Touati, V. Nivière, M. Fontecave, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8182–8188.
- [48] K. S. Quandt, D. E. Hultquist, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 9322–9326.
- [49] S. Chen, F. W. Foss, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5150–5153.
- [50] S. Chen, M. S. Hossain, F. W. Foss, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2806–2809.
- [51] S.-I. Murahashi, D. Zhang, H. Iida, T. Miyawaki, M. Uenaka, K. Murano, K. Meguro, *Chem Commun* **2014**, *50*, 10295–10298.
- [52] S. E. Hoegy, P. S. Mariano, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5027–5046.
- [53] Y. Imada, H. Iida, T. Naota, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14544–14545.
- [54] M. März, M. Babor, R. Cibulka, *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 3264–3268.
- [55] V. Mojr, G. Pitrová, K. Straková, D. Prukala, S. Brazevic, E. Svobodová, I. Hoskovcová, G. Burdziński, T. Slanina, M. Sikorski, et al., *ChemCatChem* **2018**, *10*, 849–858.
- [56] L.-J. Xie, R.-L. Wang, D. Wang, L. Liu, L. Cheng, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 10734–10737.
- [57] J. Zelenka, E. Svobodová, J. Tarábek, I. Hoskovcová, V. Boguschová, S. Bailly, M. Sikorski, J. Roithová, R. Cibulka, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 114–119.
- [58] K. A. Korvinson, G. N. Hargenrader, J. Stevanovic, Y. Xie, J. Joseph, V. Maslak, C. M. Hadad, K. D. Glusac, *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120*, 7294–7300.
- [59] T. Neveselý, E. Svobodová, J. Chudoba, M. Sikorski, R. Cibulka, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1654–1663.
- [60] L. Crocker, P. Koehler, P. Bernhard, A. Kerbs, T. Euser, L. Fruk, *Nanoscale Horiz.* **2019**, *4*, 1318–1325.
- [61] M. Jirásek, K. Straková, T. Neveselý, E. Svobodová, Z. Rottnerová, R. Cibulka, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 2139–2146.
- [62] T. Ishikawa, M. Kimura, T. Kumoi, H. Iida, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 4986–4989.
- [63] R. Ohkado, T. Ishikawa, H. Iida, *Green Chem* **2018**, *20*, 984–988.
- [64] H. Iida, R. Demizu, R. Ohkado, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 12291–12296.
- [65] A. Guarneri, W. J. van Berkel, C. E. Paul, *Pharm. Biotechnol.* **2019**, *60*, 63–71.
- [66] Y. Arakawa, R. Kawachi, Y. Tezuka, K. Minagawa, Y. Imada, *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2017**, *55*, 1706–1713.
- [67] M. Hudlicky, *Oxidations in Organic Chemistry*, American Chemical Society, Washington, DC, **1990**.
- [68] J.-E. Bäckvall, Ed. , *Modern Oxidation Methods*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2010**.
- [69] C. Kemal, T. C. Bruice, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, *73*, 995–999.
- [70] S. Weber, E. Schleicher, Eds. , *Flavins and Flavoproteins*, Springer New York, New York, NY, **2014**.
- [71] S. Ball, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4017–4019.

- [72] T. C. Bruice, J. B. Noar, S. S. Ball, U. V. Venkataram, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2452–2463.
- [73] S. Murahashi, T. Oda, Y. Masui, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5002–5003.
- [74] S.-I. Murahashi, Y. Masui, *94th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, **1987**.
- [75] S. Shinkai, T. Yamaguchi, O. Manabe, F. Toda, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 1399–1401.
- [76] Y. Imada, H. Iida, S. Ono, S.-I. Murahashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2868–2869.
- [77] A. T. Murray, P. Matton, N. W. G. Fairhurst, M. P. John, D. R. Carbery, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3656–3659.
- [78] J. Žurek, R. Cibulka, H. Dvořáková, J. Svoboda, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1083–1086.
- [79] K. Bergstad, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6650–6655.
- [80] A. A. Lindén, L. Krüger, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5890–5896.
- [81] W.-S. Li, N. Zhang, L. M. Sayre, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4507–4522.
- [82] B. J. Marsh, D. R. Carbery, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2362–2365.
- [83] T. Oonishi, T. Kawahara, Y. Arakawa, K. Minagawa, Y. Imada, *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 1791–1795.
- [84] H. Iida, Y. Imada, S.-I. Murahashi, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7599–7613.
- [85] T. Sakai, T. Kumoi, T. Ishikawa, T. Nitta, H. Iida, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 3999–4007.
- [86] J. Žurek, E. Svobodová, J. Šturala, H. Dvořáková, J. Svoboda, R. Cibulka, *Tetrahedron Asymmetry* **2017**, *28*, 1780–1791.
- [87] P. P. Poudel, K. Arimitsu, K. Yamamoto, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4163–4166.
- [88] A. A. Lindén, M. Johansson, N. Hermanns, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3849–3853.
- [89] L. Baxová, R. Cibulka, F. Hampl, *J. Mol. Catal. Chem.* **2007**, *277*, 53–60.
- [90] J. Zelenka, T. Hartman, K. Klímová, F. Hampl, R. Cibulka, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 2843–2846.
- [91] T. Hartman, J. Šturala, R. Cibulka, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 3573–3586.
- [92] C. Mazzini, J. Lebreton, R. Furstoss, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8–9.
- [93] R. Cibulka, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 915–932.
- [94] T. Sakai, M. Watanabe, R. Ohkado, Y. Arakawa, Y. Imada, H. Iida, *ChemSusChem* **2019**, *12*, 1640–1645.
- [95] G. Blaschke, H. P. Kraft, K. Fickentscher, F. Köhler, *Arzneimittelforschung.* **1979**, *29*, 1640–1642.
- [96] S.-I. Murahashi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2443–2465.
- [97] R. Jurok, J. Hodačová, V. Eigner, H. Dvořáková, V. Setnička, R. Cibulka, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 7724–7738.
- [98] V. Mojr, V. Herzig, M. Buděšínský, R. Cibulka, T. Kraus, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7599–7601.
- [99] V. Mojr, M. Buděšínský, R. Cibulka, T. Kraus, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7318.
- [100] P. Tomanová, J. Šturala, M. Buděšínský, R. Cibulka, *Molecules* **2015**, *20*, 19837–19848.
- [101] G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, G. Ottolina, M. W. Fraaije, G. Carrea, *Tetrahedron Asymmetry* **2006**, *17*, 130–135.
- [102] S. Colonna, S. D. Sordo, N. Gaggero, G. Carrea, P. Pasta, *Heteroat. Chem.* **2002**, *13*, 467–473.
- [103] H. Iida, S. Iwahana, T. Mizoguchi, E. Yashima, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15103–15113.
- [104] H. Iida, S. Iwahana, T. Mizoguchi, E. Yashima, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18150–18150.
- [105] S.-I. Murahashi, S. Ono, Y. Imada, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2366–2368.
- [106] T. C. Bruice, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 256–262.
- [107] Y. Imada, H. Iida, S. Ono, Y. Masui, S.-I. Murahashi, *Chem. – Asian J.* **2006**, *1*, 136–147.
- [108] Y. Imada, H. Iida, S.-I. Murahashi, T. Naota, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1704–1706.
- [109] Y. Imada, T. Kitagawa, H.-K. Wang, N. Komiya, T. Naota, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 621–624.
- [110] E. J. Nanni, D. T. Sawyer, S. S. Ball, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2797–2802.
- [111] Y. Arakawa, K. Yamanomoto, H. Kita, K. Minagawa, M. Tanaka, N. Haraguchi, S. Itsuno, Y. Imada, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5468–5475.

## Bibliographie

- [112] E. D. Bain, in *ACS Symp. Ser.* (Eds.: J.E. Seppala, A.P. Kotula, C.R. Snyder), American Chemical Society, Washington, DC, **2019**, pp. 7–36.
- [113] I. M. Klotz, G. P. Royer, I. S. Scarpa, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1971**, *68*, 263–264.
- [114] W. J. Spetnagel, I. M. Klotz, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 8199–8204.
- [115] J. Suh, I. S. Scarpa, I. M. Klotz, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 7060–7064.
- [116] F. Hollfelder, A. J. Kirby, D. S. Tawfik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9578–9579.
- [117] L. Liu, M. Rozenman, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12660–12661.
- [118] L. Liu, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4978–4979.
- [119] F. Avenier, F. Hollfelder, *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 12371–12380.
- [120] F. Avenier, J. B. Domingos, L. D. Van Vliet, F. Hollfelder, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7611–7619.
- [121] J. Suh, S. H. Hong, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12545–12552.
- [122] D. M. Perreault, L. A. Cabell, E. V. Anslyn, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1209–1220.
- [123] L. Di Bari, G. Pescitelli, P. Salvadori, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7998–8004.
- [124] B. J. Jordan, G. Cooke, J. F. Garety, M. A. Pollier, N. Kryvokhyzha, A. Bayir, G. Rabani, V. M. Rotello, *Chem. Commun.* **2007**, 1248–1250.
- [125] C. Lentsch, R. Fürst, J. Mulzer, U. Rinner, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 919–923.
- [126] D. J. Aitken, C. Gauzy, E. Pereira, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2359–2361.
- [127] D. Njus, P. M. Kelley, *FEBS Lett.* **1991**, *284*, 147–151.
- [128] D. Njus, P. M. Kelley, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1993**, *1144*, 235–248.
- [129] J. J. Warren, J. M. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7784–7793.
- [130] A. Katafias, O. Impert, P. Kita, J. Fenska, S. Koter, A. Kaczmarek-Kędziera, H. Różycki, A. Bajek, M. Uzarska, R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, *2014*, 2529–2535.
- [131] J. C. Deutsch, *Anal. Biochem.* **1998**, *255*, 1–7.
- [132] V. Massey, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 283–296.
- [133] Y. Dai, H. Valentino, P. Sobrado, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1609–1612.
- [134] Dan Su, Y. Orozco-Gonzalez, S. Gozem, G. Gadda, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1646–1652.
- [135] Y. Dai, H. Valentino, P. Sobrado, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1609–1612.
- [136] F. Müller, *Free Radic. Biol. Med.* **1987**, *3*, 215–230.
- [137] V. Massey, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 283–296.
- [138] A. Rostas, C. Einholz, B. Illarionov, L. Heidinger, T. A. Said, A. Bauss, M. Fischer, A. Bacher, S. Weber, E. Schleicher, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 16521–16527.
- [139] Q. Liu, X. Dong, J. Li, J. Xiao, Y. Dong, H. Liu, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 6111–6137.
- [140] K. Nakayama, Z. Sato, H. Tanaka, S. Kinoshita, *Agric. Biol. Chem.* **1968**, *32*, 1331–1336.
- [141] H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, *14*, 147–197.
- [142] A. L. Lehninger, in *Methods Enzymol.*, Academic Press, **1957**, pp. 885–887.
- [143] J. Canivet, G. Süß-Fink, P. Štěpnička, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 4736–4742.
- [144] A. F. Sasayama, C. E. Moore, C. P. Kubiak, *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 2436–2439.
- [145] A. Gabrielsson, P. van Leeuwen, W. Kaim, *Chem. Commun.* **2006**, 4926.
- [146] Z. Liu, I. Romero-Canelón, B. Qamar, J. M. Hearn, A. Habtemariam, N. P. E. Barry, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson, P. J. Sadler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3941–3946.
- [147] S. Fukuzumi, T. Kobayashi, T. Suenobu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11866–11867.
- [148] E. Kaiser, D. Lawrence, *Science* **1984**, *226*, 505–511.
- [149] O. M. Yvette, S. F. Malan, D. Taylor, E. Kapp, J. Joubert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 1287–1291.

*Publication*

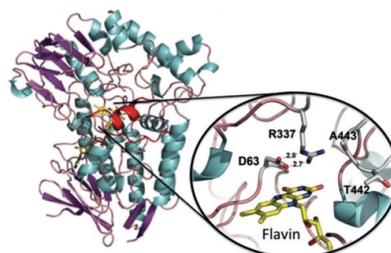
**Publication**

## Oxidation

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201810124  
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201810124**Aerobic Baeyer–Villiger Oxidation Catalyzed by a Flavin-Containing Enzyme Mimic in Water**

Yoan Chevalier, Yvette Lock Toy Ki, Didier le Nouen, Jean-Pierre Mahy, Jean-Philippe Goddard,\* and Frédéric Avenier\*

**Abstract:** Direct incorporation of molecular oxygen into small organic molecules has attracted much attention for the development of new environmentally friendly oxidation processes. In line with this approach, bioinspired systems mimicking enzyme activities are of particular interest since they may perform catalysis in aqueous media. Demonstrated herein is the incorporation of a natural flavin cofactor (FMN) into the specific microenvironment of a water-soluble polymer which allows the efficient reduction of the FMN by NADH in aqueous solution. Once reduced, this artificial flavoenzyme can then activate molecular dioxygen under aerobic conditions and result in the Baeyer–Villiger reaction at room temperature in water.



**Scheme 1.** Example of natural BVMO bearing a flavin cofactor in its active site.<sup>[28]</sup>

Selective transformation of ketones into the corresponding esters or lactones, also known as the Baeyer–Villiger (BV) reaction, prevails as a major reaction in organic synthesis since its discovery in 1899.<sup>[1]</sup> It was originally performed using persulfate in concentrated sulfuric acid and evolved towards the use of other strong oxidants such as *m*CPBA or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activated by Lewis acids.<sup>[2–4]</sup> In the present context of sustainable growth, the use of those hazardous materials, combined to the use of organic solvents, has now become a major issue for these transformations and historical chemical processes need to be replaced. Therefore, performing selective oxidation reactions by direct incorporation of an oxygen atom, from molecular dioxygen, into organic molecules under mild reaction conditions has become a priority, not only for the Baeyer–Villiger reaction, but also for other oxidation processes.<sup>[5,6]</sup>

Baeyer–Villiger monoxygenases (BVMOs) can activate dioxygen thanks to the flavin cofactor located in their active site (Scheme 1), and stand as an interesting solution to reduce the impact on the environment.<sup>[3,7]</sup> However, biochemical issues such as cloning, protein expression, and substrate selectivity reduce their scope of applications for organic synthesis and chemical alternatives are still highly needed. In

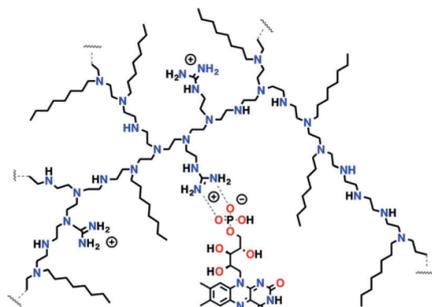
this sense, flavin derivatives have been developed as bioinspired catalysts and flavinium salts have demonstrated interesting oxidation activities using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and even O<sub>2</sub> in combination with a reductant, notably for sulfoxidation reactions.<sup>[8,9]</sup> In the particular case of the BV reaction, examples involving both a flavin derivative and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are very scarce.<sup>[10–12]</sup> So far, only two systems were described using O<sub>2</sub>, the first one involving an N5-alkylated flavinium salt,<sup>[13]</sup> and the second one a flavin unmodified at the N5 position but substituted by a peptide at the N3 position.<sup>[14]</sup> In both cases, zinc dust was added as a source of electrons and reactions were performed in a mixture of organic solvents. The next challenge is therefore to develop new systems using readily available unmodified flavins as catalysts and using dioxygen in water.

Modified polyethyleneimines (PEI) are water-soluble polymers known as good mimics for the local hydrophobic microenvironment of an enzyme's active site.<sup>[15–27]</sup> Using PEI modified with guanidinium and octyl groups, we previously showed that the incorporation of flavin mononucleotide (FMN) into such a microenvironment generated artificial flavoenzymes capable of collecting electrons from nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and then of reducing metallic cofactors under anaerobic conditions.<sup>[26,27]</sup> Here, we demonstrate that under aerobic conditions, similar artificial flavoenzymes made of FMN incorporated into PEI, modified with guanidinium and octyl groups (FMN-PEI<sup>guan-oct</sup>; Scheme 2), catalyze the oxidation of NADH and perform aerobic BV reactions in water. To the best of our knowledge, this is the first example of a non-enzymatic BV reaction performed in water using a natural flavin cofactor and dioxygen from the air.

[\*] Y. Chevalier, Prof. J.-P. Mahy, Dr. F. Avenier  
Univ Paris Sud, Université Paris Saclay, LCBB, ICMMO  
UMR CNRS 8182, 91405 Orsay (France)  
E-mail: frederic.avenier@u-psud.fr

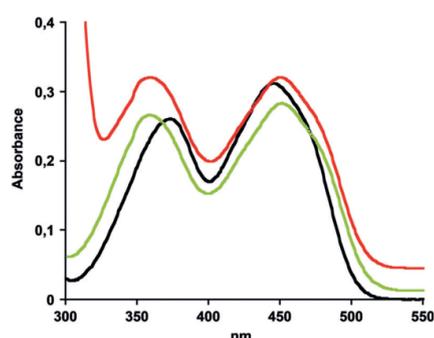
Y. Lock Toy Ki, Dr. D. le Nouen, Prof. J.-P. Goddard  
Université de Haute-Alsace, Université de Strasbourg, CNRS, LIMA  
UMR 7042, 68100 Mulhouse (France)  
E-mail: jean-philippe.goddard@uha.fr

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:  
<https://doi.org/10.1002/anie.201810124>.



**Scheme 2.** Artificial flavoenzyme (FMN-PEI<sub>guan-oct</sub>) obtained by incorporation of FMN into a 25 kDa multibranched PEI modified with guanidinium and octyl groups.

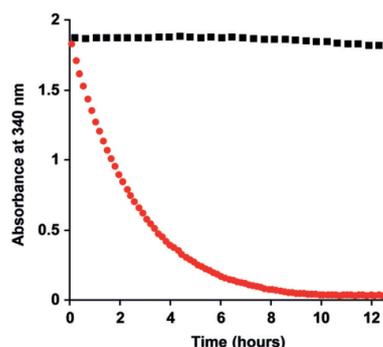
Before preparing the artificial flavoenzyme, PEI was randomly modified by the covalent incorporation of guanidinium and octyl groups and purified by dialysis as previously described.<sup>[24]</sup> After lyophilization from water, the so-formed polymer was characterized by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, which allowed the determination of the guanidinium/octyl group ratio (see Figure S1 in the Supporting Information). The FMN cofactor was then incorporated into the polymer thanks to the specific electrostatic interaction between the negatively charged phosphate groups and the guanidinium moieties. This incorporation of the FMN into the confined hydrophobic environment of the polymer was monitored by UV/Vis absorption spectroscopy, showing a characteristic 10 nm hypsochromic shift of the FMN band at 370 nm (Figure 1).<sup>[26,29,30]</sup> Importantly, we also measured the absorption spectrum of FMN-PEI<sub>guan-oct</sub> in the presence of an excess of bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one as a potential substrate, and the same 10 nm shift was observed (Figure 1, red trace). This data indicated that the excess of substrate did not exclude the FMN from the hydrophobic environment of the polymer and that the artificial flavoenzyme was not altered by the presence of substrate. It is also worth noting that previous fluorescence



**Figure 1.** UV/Visible absorption spectra of a 25 μM aqueous solution of FMN: alone (black trace), in the presence of modified PEI (25 mM in monomer; green trace), and in the presence of both PEI (25 mM in monomer) and bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one (50 mM; red trace).

spectroscopy studies showed that about 90 % of the FMN was incorporated within the local microenvironment of the polymer.<sup>[26]</sup>

FMN-PEI<sub>guan-oct</sub> was then studied in the presence of NADH and Figure 2 shows the consumption of NADH when it was added either to a solution of FMN, or to a solution of FMN-PEI<sub>guan-oct</sub>. In the absence of polymer, the concen-



**Figure 2.** Evolution of the absorbance of NADH (400 μM) at 340 nm upon addition either to an aqueous solution of FMN (2 μM; black squares) or to an aqueous solution of FMN-PEI<sub>guan-oct</sub> (red circles; FMN (2 μM) and PEI<sub>guan-oct</sub> (2 mM in monomer)).

tration of NADH remained stable over time, meaning that NADH was not able to efficiently reduce the FMN in solution. Advantageously, when the FMN was located inside the modified PEI, the kinetics of NADH consumption improved with the concentration of PEI<sub>guan-oct</sub>, reaching a maximum for a ratio of 1000 equivalents of PEI<sub>guan-oct</sub> (in monomer) with respect to the FMN cofactor. For such a ratio, the 200 equivalents of NADH were fully consumed over 10 hours. This outcome clearly indicated that the FMN could consume NADH thanks to its incorporation inside the hydrophobic environment of the polymer. This result is in agreement with previous observations made with FMN-PEI<sub>guan-oct</sub> under anaerobic conditions using stoichiometric amounts of NADH.<sup>[26]</sup> Here, the consumption of 200 equivalents of NADH with respect to the FMN demonstrates the catalytic behavior of the system, suggesting that during the process, the FMN is successively reduced to FMNH<sub>2</sub> and reoxidized by molecular dioxygen. During such a process, the FMN cofactor should therefore generate a transient peroxy species, and is reminiscent of the active intermediate formed within the catalytic cycle of BVMO.<sup>[3,7]</sup>

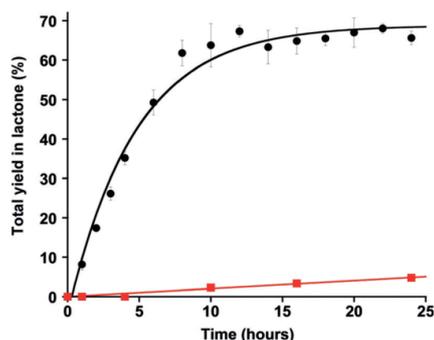
These observations prompted us to study the system for BV reaction catalysis and NADH was added to an aqueous solution of FMN-PEI<sub>guan-oct</sub> in the presence of bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one as the substrate (Table 1). After 12 hours of stirring at room temperature under an ambient atmosphere in deionized water, the solution was analyzed by GC-MS and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. It is worth noting that as FMN is light sensitive, all reactions were performed in tinted glassware to avoid any side photocatalytic reaction during the process. GC-MS analysis revealed the formation of one major

**Table 1:** Chemical and biomimetic oxidation of bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one.

Oxidation Conditions	Yields [%]				Selec. <sup>[d]</sup> [%]	Ref.
	1	2	3	4		
FMN-PEI <sub>guan-oct</sub>						
O <sub>2</sub> /NADH (pH 6.7) <sup>[a]</sup>	47	–	–	–	100	this work
O <sub>2</sub> /NADH (pH 8.0) <sup>[a]</sup>	56	8	–	–	87	this work
O <sub>2</sub> /NADH (pH 9.0) <sup>[a]</sup>	60	12	–	–	83	this work
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /acetic acid <sup>[b]</sup>	77	14	–	–	85	[31]
<i>m</i> CPBA <sup>[c]</sup>	28	–	32	37	29	[32]

[a] GC yields using [FMN] = 5  $\mu$ M; [PEI<sub>guan-oct</sub>] = 5 mM in monomer; [substrate] = 10 mM; [NADH] = 1 mM; Atmospheric O<sub>2</sub>; room temp. [b] Yield of product isolated by using reaction conditions from Ref. [31] with specific yields calculated from NMR analysis (see the Supporting Information). [c] Data from Ref. [32]. [d] Selectivity for **1**.

product with a retention time corresponding to 2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-one (lactone **1**), as well as a minor product with close retention time, 3-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-2-one (lactone **2**; see Figure S2). In both cases, the mass detection allowed clear identification of **1** and **2** (Table 1), and they were confirmed by <sup>1</sup>H NMR analysis (see Figures S3 and S4). In addition, no signal for the epoxides **3** and **4** was observed, neither by GC-MS nor by <sup>1</sup>H NMR analysis, clearly indicating the exclusive formation of the BV products. Once the lactones were identified, the reaction was monitored over time by GC (Figure 3) in 20 mM HEPES buffer at pH 8.5. The concentration of the lactones reached a plateau after 10 hours with a maximum yield of 70% with respect to NADH, together with an excellent **1/2** ratio of 87:13. This global yield corresponds to 140 turnovers and nicely correlates with the consumption of NADH observed in Figure 2. In the absence of polymer, the FMN only yielded 3% lactone, and is also in



**Figure 3.** Kinetics for the total formation of **1** and **2** catalyzed by either FMN-PEI<sub>guan-oct</sub> (FMN: 5  $\mu$ M; PEI<sub>guan-oct</sub>: 5 mM; black circles) or by FMN only (FMN: 5  $\mu$ M; red squares) 20 mM HEPES, pH 8.5 with NADH: 1 mM; substrate: 10 mM; at room temperature, under ambient atmosphere.

good agreement with the very low consumption of NADH observed (Figure 2). Other control reactions run either in the absence of dioxygen, or simply using PEI<sub>guan-oct</sub> or NADH on their own, did not yield any product. When the reaction was performed under stoichiometric conditions (10 mM both in substrate and NADH) a 42% conversion of the substrate was obtained, corresponding to 840 turnovers.

To gain more insight into this catalytic system, the pH dependency was also investigated (see Figure S5). Below pH 7, only **1** was obtained with a maximum yield of 47% at pH 6.7. For higher pH(s), a mixture of **1** and **2** was obtained, reaching a maximum global yield of 72% at pH 9 (Table 1). This trend is in good agreement with the mechanism of natural BVMO involving the nucleophilic attack of a deprotonated 4a-peroxoflavin intermediate on the carbonyl group of the substrate. However, the selectivity for the formation of **1** at acidic pH is more difficult to rationalize. One may suggest that the 4a-hydroperoxoflavin intermediate is not reactive enough to form the less favored lactone **2**.

For the sake of comparison, the chemical BV reaction was also performed using over-stoichiometric amounts of hydrogen peroxide in acetic acid,<sup>[31]</sup> and afforded a mixture of **1** and **2** in 91% yield and 85% selectivity. The biomimetic reaction using dioxygen appears, therefore, to be competitive with the use of hydrogen peroxide. Interestingly, it also compares well with the use of *m*CPBA, which was previously reported with only 29% selectivity for **1** (Table 1).<sup>[32]</sup>

This artificial enzyme is the first catalytic system utilizing unmodified natural flavin cofactor to activate dioxygen and perform the BV reaction in water. Only one catalyst using unmodified flavin at the N5 position and bearing an oligopeptide at the N3 position was described so far.<sup>[14]</sup> In this case, Imada and collaborators showed that efficient catalysis was dependent on the presence of a carboxylic acid at the C-terminus of the oligopeptide, and DFT calculations demonstrated that this carboxylic acid could actually stabilize a putative 4a-hydroperoxoflavin intermediate by hydrogen bonding. Based on these calculations, one may suggest that a similar 4a-hydroperoxoflavin intermediate could be stabilized by hydrogen bonding with the amine groups present in the microenvironment of the FMN-PEI<sub>guan-oct</sub> system. This scenario would explain the good catalytic activity of such systems. However, neither the group of Imada, nor ours, have been able to experimentally observe such 4a-hydroperoxoflavin intermediate with N5 unmodified flavin. Finally, apart from the stabilization of a 4a-hydroperoxoflavin species, catalysis could also be explained by the in situ formation of hydrogen peroxide, which was indeed observed during catalysis. However, the control experiment using hydrogen peroxide in the absence of FMN and dioxygen, only yielded 27% of lactone, suggesting that both phenomenon were probably involved in the production of lactone.

Overall, we have shown that the incorporation of the natural FMN cofactors into the locally hydrophobic microenvironment of a modified polyethyleneimine allows the flavin cofactors to collect electrons from NADH, activate dioxygen, and perform the BV reaction in good yield and with high selectivity. Such an artificial flavoenzyme stands, therefore, as a potential alternative to the use hazardous materials

such as peroxides or peracids in organic solvents and paves the way to the development of new environmentally friendly catalysts capable of using dioxygen in water.

### Experimental Section

For experimental data, please see the Supporting Information section.

### Acknowledgements

The authors thank the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE29-0006) for financial support and JPG thanks the Institut Universitaire de France for financial support.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** Baeyer–Villiger reaction · enzymes · oxidation · oxygen heterocycles · sustainable chemistry

**How to cite:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 16412–16415  
*Angew. Chem.* **2018**, *130*, 16650–16653

- [1] A. Baeyer, B. Villiger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, *32*, 3625.  
[2] G.-J. ten Brink, I. W. C. E. Arends, R. A. Sheldon, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4105–4124.  
[3] H. Leisch, K. Morley, P. C. K. Lau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165–4222.  
[4] M. Uyanik, K. Ishihara, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 513–520.  
[5] Z. Guo, B. Liu, Q. Zhang, W. Deng, Y. Wang, Y. Yang, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3480–3524.  
[6] Z. Shi, C. Zhang, C. Tang, N. Jiao, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3381–3430.  
[7] G. de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2208–2231.  
[8] R. Cibulka, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 915–932.  
[9] H. Iida, Y. Imada, S.-I. Murahashi, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7599–7613.  
[10] C. Mazzini, J. Lebreton, R. Furstoss, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8–9.  
[11] S.-I. Murahashi, S. Ono, Y. Imada, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2366–2368; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2472–2474.  
[12] J. Žurek, R. Cibulka, H. Dvořáková, J. Svoboda, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1083–1086.  
[13] Y. Imada, H. Iida, S.-I. Murahashi, T. Naota, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1704–1706; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1732–1734.  
[14] Y. Arakawa, K. Yamanomoto, H. Kita, K. Minagawa, M. Tanaka, N. Haraguchi, S. Itsuno, Y. Imada, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5468–5475.  
[15] I. M. Klotz, G. P. Royer, I. S. Scarpa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 263–264.  
[16] J. Suh, I. S. Scarpa, I. M. Klotz, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 7060–7064.  
[17] F. Hollfelder, A. J. Kirby, D. S. Tawfik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9578–9579.  
[18] J. Suh, S. H. Hong, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12545–12552.  
[19] L. Liu, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4978–4979.  
[20] L. Liu, M. Rozenman, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12660–12661.  
[21] L. Liu, W. Zhou, J. Chruma, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8136–8137.  
[22] A. Haimov, H. Cohen, R. Neumann, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11762–11763.  
[23] N. Levi, R. Neumann, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1915–1918.  
[24] F. Avenier, J. B. Domingos, L. D. Van Vliet, F. Hollfelder, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7611–7619.  
[25] F. Avenier, F. Hollfelder, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12371–12380.  
[26] Y. Roux, R. Ricoux, F. Avenier, J.-P. Mahy, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8509.  
[27] K. Cheaib, Y. Roux, C. Herrero, A. Trehoux, F. Avenier, J.-P. Mahy, *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 18098–18101.  
[28] F. M. Ferroni, C. Tolmie, M. S. Smit, D. J. Opperman, *PLoS One* **2016**, *11*, e0160186.  
[29] M. D. Greaves, R. Deans, T. H. Galow, V. M. Rotello, *Chem. Commun.* **1999**, 785–786.  
[30] B. J. Jordan, G. Cooke, J. F. Garety, M. A. Pollier, N. Kryvo-khyzha, A. Bayir, G. Rabani, V. M. Rotello, *Chem. Commun.* **2007**, 1248–1250.  
[31] C. Lentsch, R. Fürst, J. Mulzer, U. Rinner, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 919–923.  
[32] A. Corma, L. T. Nemeth, M. Renz, S. Valencia, *Nature* **2001**, *412*, 423.

Manuscript received: September 3, 2018

Revised manuscript received: October 11, 2018

Accepted manuscript online: October 24, 2018

Version of record online: November 14, 2018