



HAL
open science

Synthèse d'amines bio-sourcées à l'aide de procédés hybrides combinant des nanoparticules métalliques supportées et des transaminases

Antoine Lancien

► **To cite this version:**

Antoine Lancien. Synthèse d'amines bio-sourcées à l'aide de procédés hybrides combinant des nanoparticules métalliques supportées et des transaminases. Catalyse. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUR059 . tel-04031379

HAL Id: tel-04031379

<https://theses.hal.science/tel-04031379>

Submitted on 16 Mar 2023

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.

UNIVERSITE DE LILLE
Institut Charles Viollette

Ecole doctorale – 104 Sciences de la matière, du rayonnement et de
l’environnement

THESE

Présentée en vue de l’obtention du grade de

DOCTEUR DE L’UNIVERSITE DE LILLE

En

Biotechnologies, Agroalimentaire, Sciences de l’aliment, Physiologie

Soutenue le 15/12/2021

Par

Antoine LANCIEN

**« Synthèse d’amines bio-sourcées à l’aide de procédés hybrides
combinant des nanoparticules métalliques supportées et des
transaminases »**

Rapporteurs :

Pr. GUENIN Erwan, Université de Technologie de Compiègne

Pr. HALL Mélanie, Université de Graz

Examineurs :

Dr. HELAINE Christine, Université Clermont-Auvergne

Pr. GEFFLAUT Thierry, Université Clermont-Auvergne

Pr. HERMANS Sophie, Université catholique de Louvain

Dr.Cr. HEUSON Egon, Centrale Lille

Dr.Cr. WOJCIESZAK Robert, Centre National de la Recherche Scientifique

Pr. FROIDEVAUX Rénato, Université de Lille (directeur de thèse)

UNIVERSITE DE LILLE
Institut Charles Viollette

Ecole doctorale – 104 Sciences de la matière, du rayonnement et de
l’environnement

THESE

Présentée en vue de l’obtention du grade de

DOCTEUR DE L’UNIVERSITE DE LILLE

En

Biotechnologies, Agroalimentaire, Sciences de l’aliment, Physiologie

Soutenue le 15/12/2021

Par

Antoine LANCIEN

**« Synthèse d’amines bio-sourcées à l’aide de procédés hybrides
combinant des nanoparticules métalliques supportées et des
transaminases »**

Rapporteurs :

Pr. GUENIN Erwan, Université de Technologie de Compiègne

Pr. HALL Mélanie, Université de Graz

Examineurs :

Dr. HELAINE Christine, Université Clermont-Auvergne

Pr. GEFFLAUT Thierry, Université Clermont-Auvergne

Pr. HERMANS Sophie, Université catholique de Louvain

Dr.Cr. HEUSON Egon, Centrale Lille

Dr.Cr. WOJCIESZAK Robert, Centre National de la Recherche Scientifique

Pr. FROIDEVAUX Rénato, Université de Lille (directeur de thèse)

Citation :

« **Papa Talon : Beurk probablement, mais la science l'exige** », *Achille Talon et L'Age ingrat, Tome n°24, 1980*

Remerciements

Une thèse, ce n'est pas quelque chose que l'on peut faire tout seul, loin de là. Les idées, les projets ne peuvent s'accomplir qu'en coopérant avec tous les acteurs d'un laboratoire et tous les gens rencontrés tout au long de ces trois années. Cela paraît long, mais ça passe si vite que l'on se demande où sont passées ces trois années. La tâche paraît immense et cela rebute, mais bon on s'y fait, de toute façon, une fois lancer on n'a pas le choix.

Pour cela, je tiens à remercier en premier mes superviseurs, Rénato, Robert et Egon qui m'ont fait confiance et m'ont permis de découvrir de nombreux aspects de la recherche jusque-là encore inconnue à ma personne. Cela m'a permis de travailler sur un projet très intéressant qui continuera, j'en suis sûr. Je tiens à remercier aussi du fond du cœur l'équipe REALCAT (Svetlana, Joelle, Ophélie et Lénaïck) qui m'a apporté aide et conseils sur la partie chimie.

Je tiens particulièrement à remercier Johan pour tous les bons conseils au laboratoire et les vanes échangées au détour d'un couloir. Ça permet d'accrocher un sourire sur le visage dans les temps de dur labeur et les longues nuits d'hiver. Merci beaucoup à Edmond aussi.

Un immense merci à Eric (parti trop tôt), à qui j'oublie constamment de répondre alors qu'il prend de mes nouvelles. T'inquiète-je t'accorderai une revanche au squash (même si tu vas perdre encore).

Ah, les postdocs, vous êtes des gens à part, vraiment sans filtre. Je cite, Yuri : « tu fais de l'hybride, t'es foutu mec ». Mais tellement merci à vous tous pour vos avis éclairés, les conseils multiples et surtout la bonne humeur mise au laboratoire (j'ai complètement oublié le poste radio pour la C006 Fabien, je suis désolé). Donc merci Yuri, Fabien, Camilla, Sara, j'espère qu'on aura l'occasion de se boire une dernière bière.

Merci aux trois stagiaires que j'ai l'honneur d'encadrer, ça a été un immense plaisir de travailler avec vous j'espère de tout cœur que vous allez accomplir vos projets. Merci Sarah, Thomas et Fabio (tu vois tu l'as eu ton master et sans aucun souci mec). Votre travail a permis de faire avancer ce projet dans de nouvelles directions. Un grand merci à Théo pour les pauses clopes et les vanes (faut pas prendre son ordi au bar gros après il va en Thaïlande tout ça).

Un remerciement spécial à mes camarades doctorants : Li, Flora et Negissa. On a commencé ensemble et on va réussir à finir ensemble, on a passé la vallée, le pont, le lac et la tempête, bientôt la liberté. J'espère que vous avez tout déchiré à votre soutenance. Un remerciement particulier à Ali et Rémi, les meilleurs d'entre nous, oserais-je dire les meilleurs

doctorants que cette terre ait portés (oui j'ose Tome Jédusor). Bon courage à vous pour ces années qui s'annonce glorieuses pour vous. Ali ton talent pour former des couples est sans pareil, et Rémi, je n'oublierai pas le souvenir de cette douce nuit d'hiver, la veille de pâque, en plein mois d'aout à la capsule. Des bisous sur vous. Et n'écoutez pas les rageux.

« On s'éloiiiigne !!! », la personne concernée se reconnaitra plus que facilement dans cette expression. Un immense merci à elle pour tous les conseils, le soutien moral, les cafés, les potins (tu restes la meilleure source que j'ai jamais eue) et les services rendus tout au long de ces trois années (je n'oublierai pas le transport des meubles pendant le déménagement, ça m'a sauvé la vie). J'espère sincèrement que tes projets aboutiront, tu le mérites plus que tout !

Ah je passe au personnel, un (mot censuré, mais vous avez compris hein, ne soyons pas bête) à tous les potos, le sang comme on dit par chez nous. On se voit toujours et j'ai beaucoup trop hâte de vous revoir Bichon, Pierrot, So, Erwan, Poppy, Marie, Kiki, Titi d'amour, Simon, tritri, Cathycathoucathoche, Francis, le chef Armand et Mathou Morin. A tous les baratons, les fêtes, les bières passés et à venir. Bon courage à toi Pierrot, tu vas en baver (mais tu vas boire du vin donc ça va). Un merci tout spécial à Kellyg pour le support pendant deux années de cette thèse à Lille, j'espère que tout va bien pour toi et que tu trouveras ta voie et ton bonheur. Des bisous à Lex (ce chat de malheur, mais si mignon) et à la pouponette (arrête de me marcher sur la tronche stpmerciçaferaitplaisir).

Un grand merci à la petite pomme de terre (elle se reconnaitra), cette rencontre aussi soudaine qu'inattendue (et son prolongement surtout) a considérablement changé la perspective de cette dernière année de thèse qui n'aurait certainement pas eu la même saveur sans ta présence.

Et pour finir, la famille bien sûr, un grand merci à mes grands-parents Papy, Mamy, Papou, Mamou, merci d'être là depuis ces 26 années. Je vous fais plein de bisous. Un grand merci à mon papoune et ma mamoune qui m'ont toujours soutenue, quels que soient mes choix (on pourrait plus discuter, mais vous ne répondez pas au téléphone). Merci à ma sœur (on la connaît sous le nom de sœur), un jour je retiendrais ton choix de métier je le promets ! tu pourras m'entretenir quand je serais au chômage ! Des bisous à tous les trois !

A vous, qui lisez ce document, merci de me faire l'honneur j'espère qu'il vous satisfera et que vous trouverez du plaisir à le lire. Assez bavassé, on passe aux choses sérieuses !

Table des matières

Tables des figures	14
Tables des schémas.....	25
Tables des tableaux	27
Abréviations.....	29
Métaux et support pour la catalyse hétérogène chimique	30
Préambule	31
État de l'art.....	35
1 Contexte	36
1.1 Procédés hybrides.....	36
1.2 Procédé hybride 2P1S	38
1.2.1 Synthèse bicompartimentée : Séparation solide.....	39
1.2.2 Synthèse bi-compartimentée : séparation liquide.....	41
1.3 Procédés 1P2S et 1P1S.....	43
1.3.1 Procédé 1P2S.....	43
1.3.2 Procédé 1P1S.....	47
1.4 Procédés Hybrides avec des cellules entières	51
1.5 Matériaux multi-catalytiques hybrides.....	54
1.6 Conclusion intermédiaire	55
2 Accessibilité aux furfurylamines à partir du HMF.....	57
2.1 Réactions d'aminations réductrices sur le HMF	57
2.1.1 Voie chimique	57
2.1.2 Voie biocatalytique	61
2.2 Synthèse spécifique des composés d'oxydations	63
2.2.1 Synthèse spécifique du composé AFCA	63
2.2.1.1 Synthèse de l'AFCA par catalyse hétérogène.....	63

2.2.1.2	Synthèse de l'AFCA par biocatalyse	64
2.2.2	Synthèse spécifique du FDCA	66
2.2.2.1	Synthèse du FDCA par catalyse hétérogène	66
2.2.2.2	Synthèse du FDCA par biocatalyse	68
3	Immobilisation enzymatique : introduction du concept	70
4	Conclusion.....	73

Introduction : Développement d'un procédé hybride pour la synthèse directe de furfurylamines à partir du HMF : réflexion et stratégie 75

Chapitre 1 : Caractérisation et sélection de catalyseurs pour la synthèse directe de furfurylamines dans un procédé hybride « one-pot/two-steps » 81

1	Etude des biocatalyseurs pour la conversion de substrats furfuryliques	82
1.1	Etude d'une transaminase pour la conversion de substrats furfuryliques	82
1.2	Immobilisation de la Cv-TA	84
1.2.1	Sélection du ratio d'immobilisation sur les trois supports EziG TM	85
1.2.2	Cinétique d'immobilisation de la Cv-TA sur les supports EziG TM	86
1.2.3	Transamination du HMF et de l'AFCA avec la Cv-TA immobilisée	87
1.2.4	Recyclabilité de la Cv-TA@EziG TM OPAL	90
1.2.5	Influence du pH sur l'activité de la Cv-TA libre et immobilisée.....	91
1.2.6	Influence de la température sur la conversion du HMF/AFCA par la Cv-TA libre et immobilisée	93
2	Conclusion intermédiaire	97
3	Criblage de catalyseurs hétérogènes chimiques	99
3.1	Synthèse des standards	99
3.1.1	Synthèse du HMFA	99
3.1.2	Synthèse de l'AMFA.....	100
3.1.3	Synthèse de l'AMFC	102

3.2	Catalyseurs chimiques sélectionnés pour le criblage	102
3.3	Criblage de nanoparticules métalliques supportées pour l'oxydation sélective du HMFA en AMFC	104
3.4	Criblage de nanoparticules métalliques supportées pour l'oxydation sélective du HMF en AFCA.....	107
3.5	Caractérisation du catalyseur Pt@SiO ₂	109
3.6	Confirmation du comportement du catalyseur Pt@SiO ₂	109
4	Conclusion.....	113

Chapitre 2 : Développement d'un procédé hybride « one-pot/two-steps » pour la formation d'acide 5-amino 2-furanoïque (AMFC) à partir du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF)..... 115

1	Validation de la preuve de concept	116
2	Développement et optimisation d'un procédé hybride 1P2S	117

Chapitre 3 : Sélection et caractérisation des catalyseurs chimique et enzymatique pour le développement du procédé hybride « one-pot/one-step »..... 123

1	Introduction	124
2	Production de nouvelles transaminases potentiellement thermostables.....	126
3	Purification de la B9AZ94	132
4	Caractérisation de la B9AZ94.....	134
4.1	Influence du pH sur l'activité enzymatique	134
4.2	Etude de l'immobilisation de la Bm-TA	135
4.2.1	Sélection du support	135
4.2.2	Test d'activité de la Bm-TA@EziGTM.....	136
4.3	Influence d'oxydants chimiques sur la transamination	138
4.4	Stabilité et activité thermique.....	139
5	Synthèse et caractérisation de nouveaux catalyseurs	143

6	Criblage des catalyseurs pour l'oxydation du HMFA.....	146
6.1	Criblage en vial de 2 mL.....	146
6.2	Mise au point d'un programme robotisé pour le criblage de catalyseurs chimiques pour l'oxydation du HMFA en AMFC	152
6.2.1	Résultats du criblage pour la conversion du HMFA	155
6.2.1.1	Validation de la méthode au BLP	155
6.2.1.2	Criblage de catalyseurs au BLP en présence d'un oxydant	158
6.2.1.3	Étude détaillée des capacités catalytiques des meilleurs catalyseurs.....	159
7	Conclusion.....	161

Chapitre 4 : Mise en œuvre d'un procédé hybride « one-pot/one-step » pour la formation d'acide 5-amino 2-furanoïque (AMFC) à partir du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF). 163

1	Mise en place du procédé hybride 1P1S avec le Biolector Pro [®]	164
1.1	Procédé hybride combinant la Bm-TA@EziG TM OPAL et Au@CeO ₂	165
1.2	Procédé hybride combinant la Bm-TA@EziG TM OPAL et Au@CaO	167
1.3	Procédé hybride combinant la Bm-TA@EziG TM OPAL et Au@UiO-66_NH ₂ ou Au@TiO ₂	171
2	Conclusion.....	177

Chapitre 5 : Etude et Synthèse d'un matériau multicatalytique hybride (MMCH)..... 179

Chapitre 6 : Extension des procédés hybrides pour la synthèse de nouvelles amines issues de la biomasse 185

1	Sélection de synthons utilisés comme substrats	186
2	Réactions d'oxydations sur les substrats sélectionnés	188
3	Premiers essais concernant la mise en œuvre d'un procédé hybride en 1P1S sur les 5 substrats précédemment sélectionnés.....	191
4	Synthèse de la myrténylamine à l'aide du procédé hybride 1P2S	196

Conclusion générale	201
« Expérimental ».....	207
1 Méthodes analytiques	208
1.1 Analyses RMN	208
1.2 Analyses HPLC	208
1.3 Analyse ICP.....	208
1.4 Analyse TEM	208
1.5 Analyse XPS	209
1.6 BET	209
2 Synthèse des catalyseurs :	210
2.1 Réduction-précipitation (C1, C7).....	212
2.2 Immobilisation « sol-gel » (C2, C3, C4, C5, C6, C8, C11, C12, C23-C35).....	212
2.3 Imprégnation humide (C9, C10, C20, C21, C22)	212
a. Pt/SiO ₂ :.....	212
b. Ru/HAP :.....	213
2.4 Coprécipitation (C13, C14, C15)	213
3 Production des transaminases.....	214
3.1 Production de la Q7NWX4, Q9A3Q9 et A9CVQ7	214
3.2 Production de la B9AZ94, I2IXB4, D1C7Z3, A0KE01et Q5LMU1.....	215
3.3 Purification de la B9AZ94	215
4 Activité enzymatique.....	217
4.1 Tests d'activités au spectrophotomètre UV-Visible.....	217
a. Activités enzymatiques déterminées via un test à la LDH.....	217
b. Activités enzymatiques déterminées via un test à la (S)-MBA.....	217
c. Activités enzymatiques déterminées via un test à l'IPA	217
5 Études des paramètres de l'enzyme immobilisée.....	218

5.1	Transaminases immobilisées (Cv-TA).....	218
a.	Sélection du support d'immobilisation (Cv-TA)	218
b.	Cinétique du pourcentage d'immobilisation (Cv-TA)	218
c.	Réaction de transamination avec les enzymes immobilisées (Cv-TA)	218
d.	Recyclage de la transaminase immobilisée (Cv-TA).....	219
5.2	Stabilité thermique de la Cv-TA	219
5.3	Activité de la Cv-TA@EziG TM	219
5.4	Immobilisation de la Cv-TA@EziG TM OPAL pour la synthèse	220
6	Études enzymatiques au CARRY UV 3500.....	221
6.1	Activités enzymatiques déterminées via un test à la (S)-MBA.....	221
6.2	Immobilisation de la Bm-TA	221
6.3	Activités de l'enzyme immobilisée	221
a.	Protocole général.....	221
b.	pH stabilité	222
c.	Activité thermique.....	222
d.	Stabilité thermique	222
7	Synthèse des produits de référence	223
7.1	5- Hydroxyméthylfurfurylamine (HMFA).....	223
7.2	5- Aminométhyl-2-furancarboxaldéhyde (AMFA).....	223
7.3	Acide 5-aminométhyl-2-furannecarboxylique (AMFC)	223
7.4	Purification des produits de réaction	224
8	Criblage manuel	225
8.1	Criblage de catalyseurs pour l'oxydation du 5-hydroxyméthylfurfural	225
8.2	Criblage de catalyseurs pour l'oxydation du HMFA	225
8.3	Criblage de catalyseurs pour l'oxydation de molécules issues de la biomasse.....	226
9	Criblage automatisé.....	226
10	Réaction « one-pot/two-steps » : conversion du HMF en AMFC	227

11	Procédé hybride « one-pot/one-step »	227
11.1	En vial	227
11.2	Au BioLectorPro	228
12	Désamination oxydative	228
13	Catalyseur monosupporté	229
13.1	Immobilisation enzymatique sur le catalyseur Pd@OPAL.....	229
13.2	Réactions avec le catalyseur Pd@Bm-TA@Ezig TM OPAL.....	229
Annexes		231
Annexe A - Chapitre 1		232
	Analyses RMN	232
	Courbes de calibration HPLC-DAD	235
Annexe B – Chapitre 2		239
	Analyses RMN	239
Annexe C – Chapitre 3		243
	Immobilisation de la B9AZ94.....	243
	Caractérisations des catalyseurs	245
	Analyses XRD.....	245
	Analyses XPS.....	246
	Analyses ICP.....	248
	Analyses BET.....	249
	Programme robot du BLP	250
Annexe D – Chapitre 6.....		251
	Valorisation du 1,6-Hexanediol	251
	Valorisation du 1,5-pentanediol	253
	Valorisation du furfuryl alcohol.....	255
	Valorisation de l'acide kojique	257

Valorisation du myrténol.....	259
Annexes E – Déplacements chimiques RMN	261
« Publication »	263
Références	276

Tables des figures

Figure 1 : Schéma explicatif du procédé hybride 2P1S issu de Heuson <i>et al.</i> ⁽¹²⁾	38
Figure 2 : Schéma du procédé hybride 2P1S issu des travaux de Gimbernat <i>et al.</i> ⁽²⁷⁾ pour la production directe de HMF à partir de D-glucose.	42
Figure 3 : Structure d'un acide boronique lipophile désigné par Draffin <i>et al.</i> ⁽³⁰⁾ pour le transport amélioré des sucres au travers des membranes liquides supportées.	42
Figure 4 : Schéma explicatif du procédé hybride 1P2S issu de Heuson <i>et al.</i> ⁽⁷⁾	44
Figure 5 : Représentation générale d'une combinaison de réaction équilibrée et thermodynamiquement favorable.....	48
Figure 6 : Représentation schématique d'un procédé hybride 1P1S issu de Heuson <i>et al.</i> ⁽¹²⁾	48
Figure 7 : Représentation du procédé 1P1S mis en place par Xu <i>et al.</i> ⁽⁵⁰⁾	52
Figure 8 : Schéma récapitulatif du travail de Sirascini <i>et al.</i> ⁽⁵¹⁾ pour des réactions d'hydrogénation d'alcènes dans un procédé hybride 1P1S combinant des cellules d' <i>E. coli</i> et un métal biocompatible.	53
Figure 9 : Représentation schématique d'un matériel multicatalytique hybride (MMCHs) issu de Heuson <i>et al.</i> ⁽¹²⁾	54
Figure 10 : Structure du HMF.	57
Figure 11 : Mécanisme de transamination issu de Heuson <i>et al.</i> ⁽⁹⁾	61
Figure 12 : Structure des différents produits aminés obtenus après amination réductrice par voie biocatalytique par Dunbabin <i>et al.</i> ⁽⁹²⁾ 1. Furfuryl amine (FA) 2. 5-hydroxymethylfurfurylamine (HMFA) 3. Acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) 4. 2,5-diméthylaminefurane (FDMA) 5. 1-méthylfurfurylamine (MFA).	62
Figure 13 : Représentation de l'étape limitante lors de l'oxydation du HMF par des nanoparticules d'or supportées.	67
Figure 14 : récapitulative des différentes voies biocatalytiques pour la production du FDCA.	69
Figure 15 : stratégie globale d'immobilisation par adsorption issu de Cassimje <i>et al.</i> ⁽¹⁸⁵⁾	72
Figure 16 : Composés chimiques obtenus à partir de l'oxydation (NPs : nanoparticules métalliques supportées) des groupes hydroxyle et carbonyle de l'acide 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) : 2,5-dicarboxaldéhydefurane (DCAF), acide 5-hydroxyméthyl-2-furancarboxylique (HFCA), 5-aldéhyde-2-furancarboxylique (AFCA) et acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA) et de l'animation réductrice (TA : transaminase) des dérivés carbonylés correspondants 5-	

hydroxyméthylfurfurylamine (HMFA), 5-aminométhyle-2-furancarboxaldéhyde (AMFA), l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC).....	76
Figure 17 : Pourcentages de protéines immobilisées sur EziG™OPAL, EziG™CORAL et EziG™AMBER à température ambiante pour 6 rapports protéines/support différent (p/p, en mg) : 1:1 (■), 1:3 (□), 1:6 (□), 1:9 (□), 1:12 (□), et 1:15 (□).....	86
Figure 18 : Pourcentage de protéines immobilisées sur EziG™OPAL (●), EziG™Amber (●) and EziG™ Coral (●) à température ambiante avec un ratio 1 : 3 (p/p, mg) à 15, 30, 45, 60, 120 et 180 min.....	87
Figure 19 : Activités de Cv-TA@EziG™OPAL (●), Cv-TA@EziG™AMBER (●), Cv-TA@EziG™CORAL (●), et le blanc correspondant sans enzyme (●) sur le HMF à 30 °C. L'avancement de la réaction a été suivi spectrophotométriquement à 340 nm (disparition du NADH, test découplé à la LDH).....	88
Figure 20 : Activités de Cv-TA@EziG™OPAL (●), Cv-TA@EziG™ AMBER (●), Cv-TA@EziG™CORAL (●), et le blanc correspondant sans enzyme (●) vers AFCA à 30 °C. L'avancement de la réaction a été suivi spectrophotométriquement à 340 nm (disparition du NADH, test découplé à la LDH).....	89
Figure 21 : Conversion de l'AFCA en AMFC obtenu au cours de 3 cycles d'utilisation de l'OPAL Cv-TA@EziG™ : cycle 1 (■), cycle 2 (●) et cycle 3 (▲). La concentration en AMFC a été mesurée à 245 nm par HPLC-DAD après 0,5, 1, 2, 3, 4 et 5 h (cycle 1), ainsi que 24 h (cycle 2) et 72 h (cycle 3).....	90
Figure 22 : Cinétique de transamination du HMF en HMFA par la Cv-TA dans le tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 8 (■) et 9 (▲) avec les deux blancs correspondant sans enzyme à pH 8 (*) et 9 (□). Suivi de la formation de l'acétophénone à 245 nm.	92
Figure 23 : Cinétique de transamination du HMF en HMFA par la Cv-TA@EziG™OPAL dans deux tampons phosphate de sodium 100 mM à pH 8 (■) et 9 (▲) avec les deux blancs correspondants sans enzyme à pH 8 (*) et 9 (□). Suivi de la formation de l'acétophénone à 245 nm.....	92
Figure 24 : Cinétique de transamination du HMF en HMFA par la Cv-TA à 30 et 60 °C. Suivi de la disparition du NADH à 340 nm pour l'enzyme libre à 30 °C (■), blanc (sans enzyme) à 30 °C (*), l'enzyme libre à 60 °C (▲) blanc (sans enzyme) à 60 °C (●).	94
Figure 25 : Cinétique de transamination du HMF en HMFA par la Cv-TA@EziG™OPAL à 30 et 60 °C. Suivi de la disparition du NADH à 340 nm à 30 °C (▲), blanc (sans enzyme) à 30 °C (*), à 60 °C (■) blanc (sans enzyme) à 60 °C (●).	94

Figure 26 : Cinétique de transamination de l'AFCA en AMFC par la Cv-TA à 30 et 60 °C. Suivi de la disparition du NADH à 340 nm pour l'enzyme libre à 30 °C (▲), blanc (sans enzyme) à 30 °C (*), l'enzyme libre à 60 °C (■) blanc (sans enzyme) à 60 °C (●).	95
Figure 27 : Activités de la Cv-TA@EziG TM OPAL (■) sur l'AFCA à 60 °C, et le blanc correspondant sans enzyme (●). L'avancement de la réaction a été suivi avec le test découplé à la LDH.	96
Figure 28 : Récapitulatif des voies réactionnelles envisagées pour le développement d'un procédé hybride 1P2S pour la synthèse directe d'AMFC à partir du HMF.	98
Figure 29 : Spectre RMN 1H (D2O, 300 MHz) du HMFA.	99
Figure 30 : Suivi HPLC-DAD à 280 nm de la réaction de transamination du DCAF en AMFA par la Cv-TA à t15 (bleu), t60 (vert) et t120 min (rouge).	100
Figure 31 : RMN 1H entre 4 et 10 ppm du milieu réactionnel de la synthèse de l'AMFA et du FDMA à partir du DCAF à 180 min.	101
Figure 32 : Spectre RMN 1H (D ₂ O, 300 MHz) de l'AMFC.	102
Figure 33 : Concentrations en HMF (□), HFCA (■), AFCA (▨) FDCA (▧) mesurées par HPLC-DAD après réaction pendant 24 h, à 60 °C avec les 15 catalyseurs oxydatifs sélectionnés.	107
Figure 34 : Proposition des deux chemins et intermédiaires pour l'oxydation du HMF en FDCA.	108
Figure 35 : Image TEM du Pt@SiO ₂ et représentation graphique de la taille des nanoparticules.	109
Figure 36 : Concentrations de HMF (□), HFCA (■), AFCA (▨) FDCA (▧) et DCAF (▩) mesurées par chromatographie liquide à haute performance avec détection par barrette de diodes (HPLC-DAD) après 0, 15, 24, et 40 h. la réaction chimio-catalytique oxydative a été réalisée à 60 °C pendant 40 h dans 10 mL de tampon phosphate de sodium à pH 8, sur 10 mM de HMF et 20 mg Pt/SiO ₂ (rapport substrat/métal 1/20).	110
Figure 37 : Proposition de chemins réactionnels pour la formation d'AMFC et de FDCA directement à partir du HMF dans un procédé hybride 1P2S.	111
Figure 38 : Concentrations de HMF (□), HFCA (■), AFCA (▨) FDCA (▧) et AMFC (▩) mesurées par chromatographie liquide à haute performance avec détection par barrette de diodes (HPLC-DAD) après 0, 24, 40, 48, 64 et 68 h. La première étape chimio-catalytique oxydative a été réalisée à 60 °C pendant 64 h dans 10 mL de tampon phosphate de sodium à pH 8, sur 10 mM de HMF et 20 mg Pt/SiO ₂ (rapport substrat/métal 1/20). La seconde étape de	

transfert d'amine a été réalisée à température ambiante pendant 4 h avec 10 mg de Cv-TA immobilisée sur 30 mg de support EziG™OPAL..... 117

Figure 39 : Concentrations de HMF (■), HFCA (■), AFCA (■) FDCA (■), DCAF (■) et AMFC (■) mesurées par chromatographie liquide à haute performance avec détection par barrette de diodes (HPLC-DAD) après 0, 15, 24,40 et 44 h. La première étape chimio-catalytique oxydative a été réalisée à 60 °C pendant 40 h dans 10 mL de tampon phosphate de sodium à pH 8, sur 10 mM de HMF et 20 mg Pt/SiO₂ (rapport substrat/métal 1/20). La seconde étape de transfert d'amine a été réalisée à température ambiante pendant 4 h avec 10 mg de Cv-TA immobilisée sur 30 mg de support EziG™OPAL. 119

Figure 40 : Concentrations de HMF (■), HFCA (■), AFCA (■) FDCA (■), DCAF (■) et AMFC (■) mesurées par chromatographie liquide à haute performance avec détection par barrette de diodes (HPLC-DAD) après 0, 15, 24,40 et 44 h. La première étape chimio-catalytique oxydative a été réalisée à 60 °C pendant 40 h dans 10 mL de tampon phosphate de sodium à pH 8, sur 10 mM de HMF et 20 mg Pt/SiO₂ (rapport substrat/métal 1/20). La seconde étape de transfert d'amine a été réalisée à température ambiante pendant 4 h avec 10 mg de Cv-TA immobilisée sur 30 mg de support EziG™OPAL. 120

Figure 41 : Couverture du ChemCatChem pour la valorisation du procédé hybride 1P2S sur la conversion du HMF en AMFC..... 122

Figure 42 : Structure des produits potentiels obtenus lors de la mise en œuvre du procédé hybride 1P1S combinant des nanoparticules métalliques supportées et une transaminase à partir du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF). Produit d'oxydation : 2,5-dicarboxaldéhydefurane (DCAF), acide 5-hydroxyméthyl-2-furancarboxylique (HFCA), 5-aldéhyde-2-furancarboxylique (AFCA) et acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA). Dérivés monoaminés 5-aminométhyle-2-furancarboxaldéhyde (AMFA), 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) et 5-hydroxyméthylfurfurylamine (HMFA). Dérivés diaminés : diaminométhylfurane (FDMA)..... 125

Figure 43 : Gels d'électrophorèse réalisés sur les lysats cellulaires après la lyse cellulaire (French Press, 2.4 bars, 1. B9AZ94 2. I2IXB4 3. D1C7Z3 4. A0KE01 5. 3HMU) 127




















Figure 44 : Gels d'électrophorèse réalisés sur les lysats cellulaires après french press A) Production après induction à l'IPTG B) Témoin sans induction à l'IPTG C) Lysats cellulaires obtenus après FP D) Débris cellulaires obtenus après FP (1. B9AZ94 2. I2IXB4 3. D1C7Z3 4. A0KE01 5. 3HMU). 130

Figure 45 : Gels d'électrophorèse (gauche) effectués sur les différentes fractions de la purification de la B9AZ94 (1. Eaux de lavage 2. Fraction de tête 3. Fraction de corps 4. Fraction de queue).	132
Figure 46 : Concentrations en protéines déterminées par Bradford à 595 nm post-purification de la B9AZ94 pour les fractions de lavage, de tête, de corps et de queue.	133
Figure 47 : Réaction de transamination du pyruvate par la <i>Bm</i> -TA sur une gamme de pH allant de 5,5 à 8 avec la (<i>S</i>)-MBA comme donneur d'amine. (pH 5,5 et 6 tampon citrate (■) 100 mM, pH 6 à 8 KH ₂ PO ₄ (■)100 mM et pH 8 tampon TRIS (■)100 mM).....	134
Figure 48 : Pourcentage d'immobilisation de la <i>Bm</i> -TA après 60 mn d'incubation à température ambiante dans un tampon KH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 7,3 mesurée par Bradford à 595 nm sur OPAL (■), CORAL (■) et AMBER (■).....	135
Figure 49 : Rendement d'activité de la <i>Bm</i> -TA@EziG TM (OPAL, CORAL et AMBER) sur le pyruvate (■) et sur le HMF (■) mesurés à 245 nm par la mesure de l'augmentation de la concentration en acétophénone. (Donneur (<i>s</i>)-MBA).	136
Figure 50 : Taux de conversion du pyruvate en alanine par la <i>Bm</i> -TA@EziG TM OPAL (■), <i>Bm</i> -TA@EziG TM CORAL (■), <i>Bm</i> -TA@EziG TM AMBER (■) avec un ratio d'immobilisation 1/5 (enzyme/support, g/g).....	137
Figure 51 : Activité initiale mesurée sur la transamination du pyruvate avec la (<i>S</i>)-MBA comme donneur en présence d'une concentration graduelle de H ₂ O ₂ (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 et 5 mM) avec le <i>Bm</i> -TA libre (■) et immobilisée sur le support EziG TM OPAL (■).	138
Figure 52 : Thermo activité de la <i>Bm</i> -TA (■) et de la <i>Bm</i> -TA@EziG TM OPAL (■) mesurées au CARY UV 3500 par l'intermédiaire du test avec la (<i>s</i>)-MBA (mesure de l'augmentation de l'acétophénone à 245 nm) de 15 °C à 85 °C avec un pas de 5 °C.	140
Figure 53 : Stabilité thermique de la <i>Bm</i> -TA à 30 (●), 35 (●), 40 (●), 45 (●), 50 (●), 55 (●), 60 (●) et 65 °C (●) mesurée au CARY UV 3500 après 16, 24 et 48 h d'incubation dans un tampon KH ₂ PO ₄ , 100 mM, pH 7,3. Activité mesurée grâce au test avec la (<i>S</i>)-MBA et le HMF comme accepteur.....	141
Figure 54 : Stabilité thermique de la <i>Bm</i> -TA@EziG TM OPAL à (●), 35 (●), 40 (●), 45 (●), 50 (●), 55 (●), 60 (●) et 65 °C (●) mesurée au CARY UV 3500 après 16, 24 et 48 h d'incubation dans un tampon KH ₂ PO ₄ , 100 mM, pH 7,3. Activité mesurée grâce au test avec la (<i>S</i>)-MBA sur le HMF.	142
Figure 55 : Schéma réactionnel de l'oxydation du HMFA en AMFC.	146

Figure 56 : Pourcentage de conversion du HMFA (■) et rendement envers l'AMFC (■) observé lors du criblage d'oxydation manuel par 33 catalyseurs dur le HMFA à 50 °C dans un tampon phosphate de potassium (pH7.3, 100 mM).	147
Figure 57 : Chromatogramme HPLC du milieu réactionnel pour l'oxydation du HMFA en vial par le catalyseur Au@CaO (C4).	148
Figure 58 : Images TEM de Au@CaO (A 10 nm, B 20 nm).	148
Figure 59 : Images TEM de Au/TiO ₂ (A 10 nm, B 20 nm) et de Au/CeO ₂ (C 10 nm D 20 nm).	151
Figure 60 : Illustration du circuit effectué par le BLP pour le criblage de catalyseur d'oxydation en phase liquide pour la conversion du HMFA en AMFC.....	153
Figure 61 : Illustration d'une Round-plate (RP, gauche) et d'une Flower-plate (FP, droite).	154
Figure 62 : Rendement de production des furfurylamines après 48 h d'oxydation du HMFA réalisés en vials (HMFA ■, AMFA □, et AMF C□), au BLP (HMFA ■, AMFA □, et AMFC □), au BLP + 0,5 mM de H ₂ O ₂ (HMFA ■, AMFA ■, et AMFC □), BLP + 0,5 mM de KMnO ₄ (HMFA ■, AMFA ■, et AMFC ■) pour le catalyseur Au@CaO (A) Au@TiO ₂ (B), Au@UiO-66-NH ₂ (C), et Au@CeO ₂ (D).	161
Figure 63 : Evolution de la concentration des produits réactionnels (HMF□, HMFA■, AMFA ■ et AMFC ■) au cours du temps dans le procédé hybride effectué avec le BLP et combinant le catalyseur Au@CaO et la <i>Bm</i> -TA@EziG TM OPAL pour la réaction Hyb _{8(C4)} -1. Les prélèvements ont été analysés après 16, 24, 32 et 48 h par HPLC-DAD à 210 (HMFA), 245(AMFC) et 280 (HMF).....	167
Figure 64 : Concentration mesurée en HPLC-DAD du HMFA (■) et de l'AMFC (■) à t32 h pour les 12 réactions hybrides combinant la <i>Bm</i> -TA immobilisée sur support OPAL et le catalyseur Au@CaO (C4).	169
Figure 65 : Spectre MALDI-TOF du précipité brun récupéré après mise en œuvre du procédé hybride 1P1S combinant 8 mg d'Au@CaO et 200 µg de <i>Bm</i> -TA immobilisée sur 1 mg de support OPAL.	170
Figure 66 : Rendement en AMFC dans différents milieux réactionnels après 48 h de mise en œuvre du procédé hybride combinant des nanoparticules métalliques supportées (Au@TiO ₂ ■ et Au@UiO-66-NH ₂ ■) et une transaminase immobilisée (<i>Bm</i> -TA@EziG TM OPAL). Les concentrations sont mesurées par HPLC-DAD à 245 nm.....	171
Figure 67 : Evolution de la concentration des produits réactionnels (HMF □, HMFA ■, et AMFC ■) au cours du temps dans le procédé hybride effectué avec le BLP et combinant le	

catalyseur Au@CaO et la <i>Bm</i> -TA@EziG TM OPAL pour la réaction Hyb _{8(C24)} -1. Les prélèvements ont été analysés après 16h, 32 h et 48 h par HPLC-DAD à 210 (HMFA), 245(AMFC) et 280 (AMFA) nm.....	173
Figure 68 : Représentation de la structure 3D de la <i>Bm</i> -TA (Unipro Access Number : B9AZ94) avec les acides aminés polaires représentés en bleu.....	176
Figure 69 : RMN ¹ H du milieu réactionnel après 6 h de transamination avec le <i>Bm</i> -TA@Pd@EziG TM OPAL à température ambiante.....	182
Figure 70 : Structure des molécules criblées pour la valorisation du procédé hybride.....	186
Figure 71 : RMN ¹ H de la réaction d'oxydation du myrténol à t48 h à 50 °C. Les réactions sont effectuées dans un vial de GC fermés de 2 ml. La solution mère est composée de 10 mM de myrténol dans un tampon phosphate de potassium 100 mM à pH 7,3 et mis à l'étuve sur un carrousel à 25 rpm et à 50 °C. 4 mg du catalyseur désiré sont ajoutés au milieu. (A. Blanc réactionnel sans catalyseur B. Réaction avec le catalyseur Au@UiO-66_NH ₂ C. Réaction avec le catalyseur Au@CaO D. Réaction avec le catalyseur Au@TiO ₂ E. Réaction avec le catalyseur Au@CeO ₂).....	190
Figure 72 : RMN ¹ H (300 MHz, D ₂ O) à t48 h des produits présents dans le procédé hybride « one-pot/one-step » lors de la synthèse de la myrténylamine à partir du myrténol. Les réactions ont été effectuées en vial de GC scellés (2 ml) sur 10 mM de myrténol dans un tampon KH ₂ PO ₄ 100 mM pH 7,3 avec 10 mM de (<i>S</i>)-MBA et 1 mM de PLP. On introduit 4 mg de catalyseur et 200 µg de <i>Bm</i> -TA immobilisée sur un support EziG TM @OPAL A. Blanc réactionnel sans catalyseur B. Myrténylamine C. Au@UiO-66_NH ₂ (C24) D. Au@CaO (C4) E. Au@TiO ₂ (C31) F. Au@CeO ₂ (C22).....	193
Figure 73 : Suivi cinétique RMN de l'oxydation du myrténol par RMN ¹ H à 8,16,24,32,40 et 48 h par un catalyseur Au@TiO ₂ dans un milieu tamponnée (pH 7.3, 100 mM) à 50°C.....	195
Figure 74 : RMN ¹ H (D ₂ O, 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH ₂ PO ₄ pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM de myrténol avec 10 mM de (<i>S</i>)-MBA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 µg de <i>Bm</i> -TA immobilisé sur 1 mg de EziG TM OPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C. A. Blanc de réaction (sans catalyseur) B. Blanc sans enzyme, Au@CeO ₂ C. Blanc sans enzyme, Au@TiO ₂ D. Au@CeO ₂ + <i>Bm</i> -TA libre E. Au@CeO ₂ + <i>Bm</i> -TA immobilisée F. Au@TiO ₂ + <i>Bm</i> -TA libre G. Au@TiO ₂ + <i>Bm</i> -TA immobilisée.....	197
Figure 75 : Spectre RMN ¹³ C (D ₂ O, 300 MHz, DEPT 45) du HMFA.	232
Figure 76 : Spectre RMN ¹³ C (D ₂ O, 300 MHz, DEPT 135) du HMFA.	232
Figure 77 : Spectre RMN HSQC (D ₂ O, 300 MHz) du HMFA.	233

Figure 78 : Spectre RMN ¹³ C (D ₂ O, 300 MHz, DEPT 45) de l'AMFC.....	233
Figure 79 : Spectre RMN ¹³ C (D ₂ O, 300 MHz, DEPT 135) de l'AMFC.....	234
Figure 80 : Spectre RMN HSQC (D ₂ O, 300 MHz) du HMFA.....	234
Figure 81 : Courbe de calibration HPLC-DAD du HMF. Figure 82 : Courbe de calibration HPLC-DAD du DCAF.....	235
Figure 83 : Courbe de calibration HPLC-DAD du HFCA Figure 84 : Courbe de calibration HPLC-DAD de l'AFCA.....	235
Figure 85 : Courbe de calibration HPLC-DAD du FDCA. Figure 86 : Courbe de calibration HPLC-DAD du HMFA.....	235
Figure 87 : courbe de calibration HPLC-DAD de l'AMFC.....	236
Figure 88 : Spectre RMN ¹ H (D ₂ O, 300 MHz) du blanc (sans catalyseur) de la désamination oxydative à t48 h à 60 °C du 5-Hydroxyméthyl-2-aminométhylfurane (HMFA).	237
Figure 89 : Spectre RMN ¹ H (D ₂ O, 300 MHz) de désamination oxydative à t48 h à 60 °C du 5-Hydroxyméthyl-2-aminométhylfurane (HMFA).	238
Figure 90 : RMN ¹ H entre 6 et 8,5 ppm du milieu réactionnel brut de la mise en oeuvre d'un procédé hybride 1P2S combinant un catalyseur Pt@SiO ₂ et la Cv-TA@EziG TM OPAL	239
Figure 91 : Spectre RMN ¹ H du premier processus catalytique hybride à un pot/deux étapes pour la conversion de HMF en AMFC après 68 h de réaction.....	240
Figure 92 : Spectre RMN ¹ H du blanc (aucun catalyseur chimique ajouté) correspondant au premier processus catalytique hybride à un pot/deux étapes, après 74 h de réaction avec de la (S)-MBA comme donneur d'amine, avec le HMFA comme produit unique de la réaction. .	240
Figure 93 : Spectre RMN ¹ H du 2ème procédé catalytique hybride à un pot/deux étapes pour la conversion de HMF en AMFC après 52 h de réaction avec de la MBA comme donneur d'amine.....	241
Figure 94 : Spectre RMN ¹ H du blanc (aucun catalyseur chimique ajouté) correspondant au 2ème processus catalytique hybride à un pot/deux étapes, après 52 h de réaction avec de la MBA comme donneur d'amine, avec le HMFA comme produit unique de la réaction.	241
Figure 95 : Spectre RMN ¹ H du 3ème procédé catalytique hybride à un pot/deux étapes pour la conversion de HMF en AMFC après 52 h de réaction avec l'IPA comme donneur d'amine.	242
Figure 96 : Spectre RMN ¹ H du blanc (aucun catalyseur chimique ajouté) correspondant au troisième processus catalytique hybride à un pot/deux étapes, après 52 h de réaction avec de l'IPA comme donneur d'amine, avec le HMFA comme produit unique de la réaction.....	242

Figure 97 : Pourcentage d'immobilisation de la B9AZ94 (1 mg, <i>Bm</i> -TA) sur 5 mg de support Ezig TM .(OPAL  , CORAL  et AMBER ) Les concentrations sont mesurées par l'intermédiaire d'un dosage au réactif de Bradford.	243
Figure 98 : Pourcentage d'immobilisation de la B9AZ94 (1 mg, <i>Bm</i> -TA) sur 10 mg de support Ezig TM .(OPAL  , CORAL  et AMBER ) Les concentrations sont mesurées par l'intermédiaire d'un dosage au réactif de Bradford.	243
Figure 99 : Pourcentage d'immobilisation de la B9AZ94 (1 mg, <i>Bm</i> -TA) sur 15 mg de support Ezig TM .(OPAL  , CORAL  et AMBER ) Les concentrations sont mesurées par l'intermédiaire d'un dosage au réactif de Bradford.	244
Figure 100 : Spectre XRD des catalyseurs 1) Pd@TiO ₂ 2) 0.9Au-0.1Pd@TiO ₂ 3) 0.5Au-0.5Pd@TiO ₂ 4) 0.1Au-0.9Pd@TiO ₂	245
Figure 101: Spectre XRD des catalyseurs 1) Au@ZrO ₂ 2) Au@TiO ₂ 3) Au@MgO 4) Au@CaO.	245
Figure 102 : Analyse XPS du catalyseur Au@SiO ₂ et Au@CaO ( enveloppe Au 4f/7,  Au 4f/7/2_Au4f/7,  Au 4f/5/2_Au4f/7).	246
Figure 103 : Analyse XPS du catalyseur Au@MgO et Au@SiO ₂ ( enveloppe Au 4f/7,  Au 4f/7/2_Au4f/7,  Au 4f/5/2_Au4f/7  Mg 2 s).	246
Figure 104 : Analyse XPS du catalyseur Au@CeO ₂ et Au@TiO ₂ ( Enveloppe Au 4 f/8  Au 4 f 7/2  Au 4 f 5/2).	247
Figure 105 : Capture d'écran du programme robot effectué au BLP pour le criblage de catalyseur hétérogène d'oxydation et la mise en œuvre de procédés hybrides 1P1S.	250
Figure 106 : RMN ¹ H (D ₂ O, 300 MHz) à t 48 h de l'oxydation <i>l</i> ,6-hexanediol dans un tampon KH ₂ PO ₄ pH 7.3 100 mM à 50°C. 4 mg de catalyseur chimique sont introduits dans un vial de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à l'étuve. A. Blanc de réaction (sans catalyseur) B. Au@UiO-66_NH ₂ (C24) C. Au@CaO (C4) D. Au@TiO ₂ (C31) E. Au@CeO ₂ (C22).	251
Figure 107 : RMN ¹ H (D ₂ O, 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH ₂ PO ₄ pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM de <i>l</i> ,6-hexandiol avec 10 mM de (<i>S</i>)-MBA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 µg de <i>Bm</i> -TA immobilisé sur 1 mg de EziG TM OPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C. A. Blanc de réaction (sans catalyseur) B. Blanc sans enzyme C. Au@CaO (C4) D. Au@TiO ₂ (C31) E. Au@CeO ₂ (C22).	252
Figure 108 : RMN ¹ H (D ₂ O, 300 MHz) à t 48 h de l'oxydation <i>l</i> ,5-pentanediol dans un tampon KH ₂ PO ₄ pH 7.3 100 mM à 50°C. 4 mg de catalyseur chimique sont introduits dans un vial de	

GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à l'étuve. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Au@UiO-66_NH₂ (C24) **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO₂ (C31) **E.** Au@CeO₂ (C22). 253

Figure 109 : RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH₂PO₄ pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM de 1,5_pentanediol avec 10 mM de (S)-MBA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 µg de *Bm*-TA immobilisé sur 1 mg de EziGTMOPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Blanc sans enzyme **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO₂ (C31) **E.** Au@CeO₂ (C22)..... 254

Figure 110 : RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) à t 48 h de l'oxydation du furfuryl alcool dans un tampon KH₂PO₄ pH 7.3 100 mM à 50°C. 4 mg de catalyseur chimique sont introduits dans un vial de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à l'étuve. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Au@UiO-66_NH₂ (C24) **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO₂ (C31) **E.** Au@CeO₂ (C22).... 255

Figure 111 : RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH₂PO₄ pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM de furfuryl alcool avec 10 mM de (S)-MBA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 µg de *Bm*-TA immobilisé sur 1 mg de EziGTMOPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Au@UiO-66_NH₂ (C24) **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO₂ (C31) **E.** Au@CeO₂ (C22)..... 256

Figure 112 : RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) à t 48 h de l'oxydation de l'acide kojique dans un tampon KH₂PO₄ pH 7.3 100 mM à 50°C. 4 mg de catalyseur chimique sont introduits dans un vial de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à l'étuve. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Au@UiO-66_NH₂ (C24) **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO₂ (C31) **E.** Au@CeO₂ (C22).... 257

Figure 113 : RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH₂PO₄ pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM d'acide kojique avec 10 mM de (S)-MBA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 µg de *Bm*-TA immobilisé sur 1 mg de EziGTMOPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Au@UiO-66_NH₂ (C24) **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO₂ (C31) **E.** Au@CeO₂ (C22)..... 258

Figure 114 : RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH₂PO₄ pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM de myrténol avec 100 mM d'IPA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 µg de *Bm*-TA immobilisé sur 1 mg de EziGTMOPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Blanc sans enzyme,

Au@CeO ₂ C. Blanc sans enzyme, Au@TiO ₂ D. Au@CeO ₂ + <i>Bm</i> -TA immobilisé E. Au@CeO ₂ + <i>Bm</i> -TA libre F. Au@TiO ₂ + <i>Bm</i> -TA immobilisé G. Au@TiO ₂ + <i>Bm</i> -TA libre.	259
Figure 115 : Spectre RMN ¹ H (D ₂ O, 300 MHz) de la myrténylamine.	260

Tables des schémas

Schéma 1 : Schéma réactionnel général représentant le procédé hybride pour la valorisation directe du HMF en 2,5-diaminométhylfurane (FDMA), 5-aminométhylfurfural (AMFA) et acide 5-aminométhylfuranoïque (AMFC) au travers d'une combinaison de nanoparticules métalliques supportées et d'une transaminase.	33
Schéma 2 : Schéma général réactionnel du procédé hybride 2P1S mis au point par Sato <i>et al</i> ⁽²¹⁾ pour la synthèse directe de 1-phényléthanol à partir de styrène.	39
Schéma 3 : Schéma général réactionnel du procédé hybride 2P1S mis au point par Schaaf <i>et al</i> ⁽²⁶⁾ pour la synthèse directe et énantiosélective de composés aminés optiquement purs.	40
Schéma 4 : Représentation du procédé hybride 1P2S adapté de Burda <i>et al.</i> ⁽³⁹⁾ pour la synthèse énantiosélective d'alcool optiquement pur <i>via</i> une catalyse au palladium couplée à une alcool déshydrogénase (ADH).	44
Schéma 5 : Représentation du procédé hybride 1P2S adapté de Paris <i>et al.</i> ⁽⁴⁰⁾ pour la synthèse énantiosélective d'amine grâce au couplage d'une catalyse hétérogène au palladium et d'une transaminase.	45
Schéma 6 : Représentation du procédé hybride 1P2S adapté de Sand <i>et al.</i> ⁽⁴²⁾ pour la synthèse d'aldéhyde à partir d'ester grâce à la combinaison d'une lipase et de nanoparticules de cuivre.	47
Schéma 7 : Schéma réactionnel du travail effectué par Mutti <i>et al.</i> ⁽⁵⁰⁾ pour la synthèse directe d'alcools optiquement purs dans un procédé hybride 1P1S combinant un catalyseur hétérogène à l'iridium et une alcool déshydrogénase.	49
Schéma 8 : Schéma réactionnel du travail effectué par Rios-Lombarda <i>et al.</i> ⁽⁴⁵⁾ pour la synthèse directe d'alcools optiquement purs à partir d'un mélange racémique dans un procédé hybride 1P1S combinant un catalyseur au ruthénium et une oxydoréductase.	49
Schéma 9 : Schéma réactionnel du travail effectué par Xu <i>et al.</i> ⁽⁵⁰⁾ pour la synthèse d'alcools optiquement purs dans un procédé hybride 1P1S combinant un photocatalyseur et des cellules complètes.	51
Schéma 10 : Réaction générale employée par Wang <i>et al.</i> ⁽⁸⁷⁾ pour la synthèse du FDMA à partir du HMF.	58
Schéma 11 : Réaction générale employée par Ayedi <i>et al.</i> ⁽⁹⁰⁾ pour la synthèse de la furfurylamine à partir du furfural.	59
Schéma 12 : Schéma réactionnel de la réaction de transamination du pyruvate de sodium en L-alanine avec la MBA comme donneur d'amine.	82

Schéma 13 : Schéma du test à la LDH pour mesurer l'activité de la Cv-TA sur différents substrats furfuryliques.	83
Schéma 14 : Test à la LDH découplé pour mesurer l'activité de la Cv-TA sur différents substrats furfuryliques à 30 et 60 °C.	93
Schéma 15 : Équation bilan attendue pour l'oxydation du HMFA en AMFC.	104
Schéma 16 : Équation bilan attendue pour l'oxydation du HMF en AFCA.	107
Schéma 17 : Schéma réactionnel de la réaction de désamination oxydative sur le HMF par le catalyseur Pt@SiO ₂	112
Schéma 18 : Catalyse hybride « one-pot/two-steps » appliquée à la conversion du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) en acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC), combinant le catalyseur hétérogène Pt/SiO ₂ et la transaminase <i>Chromobacterium violaceum</i> (Cv-TA) immobilisée sur EziG TM OPAL.	116
Schéma 19 : Récapitulatif du test enzymatique avec l'isopropylamine (IPA). Suivi de la disparition du HMF à 280 nm.	127
Schéma 20 : Système catalytique hybride 1P1S étudié pour la formation de furfurylamines à partir de HMF.	164
Schéma 21 : Schéma réactionnel général représentant un procédé hybride pour la valorisation directe de molécules issues de la biomasse.	202

Tables des tableaux

Tableau 1 : Valorisation du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) en 2,5-dihydroxyméthylfurane (DHMF), 2,5-dicarboxaldéhydefurane (DCAF), acide 5-hydroxyméthyl-2-furancarboxylique (HFCA), acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA), éthoxyméthylfurfural (EMF) et diméthylfurane (DMF).	32
Tableau 2 : Récapitulatif des différents niveaux d'intégration des procédés hybrides issus de Heuson <i>et al.</i> ⁽¹²⁾	37
Tableau 3 : Synthèse des voies d'accès chimiques aux furfurylamines et leurs dérivés.	60
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des catalyseurs hétérogène d'oxydations chimiques utilisé pour la conversion du HMF en FDCA.	66
Tableau 5 : Défis identifiés pour la synthèse directe de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique à partir du HMF grâce à la mise place d'un procédé hybride 1P2S.	77
Tableau 6 : Défis identifiés pour la synthèse directe de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique à partir du HMF au travers de la mise place d'un procédé hybride 1P1S.	78
Tableau 7 : Activités spécifiques mesurées de la C _v -TA sur le HMF, l'AFCA et le DCAF au travers d'un test découplé à la LDH (Tampon de phosphate de sodium 100 mM (pH 8), 2 mM de substrat, 5 U. ml ⁻¹ LDH, 0,5 mg.ml ⁻¹ NADH, 0,1 mM PLP, 0,1 mg.ml ⁻¹ C _v -TA CFE, et 10 mM L-alanine).	84
Tableau 8 : Catalyseurs hétérogènes pour réaliser le criblage de l'oxydation du HMF et du HMFA (*déterminé par ICP).	103
Tableau 9 : Concentration des réactifs (en mM) mesurée par HPLC-DAD pour 15 catalyseurs d'oxydations après 48 h à 60 °C dans un tampon KH ₂ PO ₄ (pH 8, 100 mM).	105
Tableau 10 : Concentrations des produits réactionnels mesurées par HPLC-DAD à t ₀ , 24 et 48 h lors de la réaction de désamination oxydative du HMFA par le catalyseur Pt@SiO ₂	112
Tableau 11 : Description des différentes enzymes.	126
Tableau 12 : Quantité de protéines totales et activités (mU.mg ⁻¹) obtenues sur les lysats cellulaires (production en LB) des 5 transaminases.	128
Tableau 13 : Protéines totales et activités obtenues sur les lysats cellulaires (production en TB) des 5 enzymes thermostables.	131
Tableau 14 : Liste des catalyseurs utilisés pour l'oxydation du HMFA.	144
Tableau 15 : Conditions retenues pour le criblage des catalyseurs d'oxydation sur le HMFA effectué au BLP.	155

Tableau 16 : Conversion du HMFA mesurée par HPLC-DAD après 48 h d'oxydation au BLP et en vials.....	156
Tableau 17 : Conversion du HMFA et rendement d'obtention de l'AMFC mesuré par HPLC-DAD après 48 h d'oxydation au BLP avec 0,5 mM de H ₂ O ₂ et KMnO ₄	158
Tableau 18 : Définition de la nomenclature du procédé hybride 1P1S mis en œuvre avec le BLP.....	165
Tableau 19 : Calcul du nombre d'unités supposé du polyimine formé.	170
Tableau 20 : Taux de conversion et rendement en AMFC pour la reproduction du procédé 1P1S en vial.	174
Tableau 21 : Taux de conversion à t 48 h obtenu lors de la mise en œuvre du procédé hybride 1P1S contenant le MMCH <i>Bm</i> -TA@Pd@EziG TM OPAL pour la conversion directe du HMF en AMFC.	183
Tableau 22 : Schémas réactionnels des réactions d'oxydation en phase liquide sur 1) le 1,5-pentandiol 2) le 1,6-hexandiol 3) le furfuryl alcool 4) l'acide kojique 5) le myrténol.....	189
Tableau 23 : Récapitulatif des 38 catalyseurs utilisés pour des réactions d'oxydations en phase liquide.....	210
Tableau 24 : Composition des solutions 1 et 2 utilisées pour la purification enzymatique..	216
Tableau 25 : Pourcentage de métal dans les catalyseurs analysés par ICP.....	248
Tableau 26 : Résultats BET obtenu sur l'analyse des catalyseurs sélectionnés.	249

Abréviations

Analyses :

CCM : Chromatographie sur couche mince

RMN : résonance magnétique nucléaire

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

GC : Chromatographie en phase gazeuse

DAD : détecteur à barrette de diode

ICP : spectroscopie d'émission à plasma optique inductif

TEM : Microscope à transmission électronique

XPS : spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X

BET : Théorie Brunauer, Emmett et Teller (mesure de surface spécifique)

Produits chimiques :

(S)-MBA: (S)-Methylbenzylamine

IPA: Isopropylamine

KH₂PO₄: Phosphate de potassium

NaH₂PO₄: Phosphate de sodium

KCl : Chlorure de potassium

NaOH : hydroxyde de sodium

HCl : Acide chloridrique

PVA : Alcool polyvinylique

NADH : hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide

IPTG : isopropyl-β-D-thiogalactoside

D₂O : Deutérium oxyde

PLP : Phosphate de pyridoxal

MeOH : Méthanol

HMF : 5-hydroxyméthylfurfural

HFCA : acide 5-hydroxyméthyl-2-furancarboxylique

AFCA : 5-aldéhyde-2-furancarboxylique

DCAF : 2,5-dicarboxaldéhydefurane

FDCA : acide 2,5-furandicarboxylique

HMFA :5-hydroxyméthylfurfurylamine

AMFA : 5-aminométhyle-2-furancarboxaldéhyde

FDMA : Dihydroxyaminofurane

AMFC : acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique

EMF : éthoxyméthylfurfural

DMF : diméthylfurane

DHMF : 2,5-dihydroxyméthylfurane

H₂ : dihydrogène

Ar : Argon

Enzymes :

TA : Transaminase

LDH : Lacate déshydrogénase

CFE: Cell free extract

BSA: Bovine sérum albumine

Appareillage:

BLP: BioLector Pro[®]

SP: Speed Vac

FP: Flower plate

RP: Round Plate

Métaux et support pour la catalyse hétérogène chimique

Métal :

Au : Or

Pd : Palladium

Pt : Platine

Ru : Ruthénium

Cu : Cuivre

Support :

TiO₂ : Dioxyde de titane

CeO₂ : Dioxyde de cérium

SiO₂ : Dioxyde de
silicium

ZrO₂ : Dioxyde de
zirconium

Al₂O₃ : Oxyde
d'aluminium

Fe₃O₄ : Tétroxyde de trifer

MgO : Oxyde de
magnésium

CaO : Oxyde de calcium

CN : Carbon nitrile

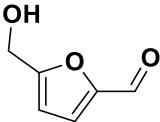
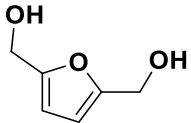
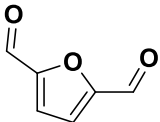
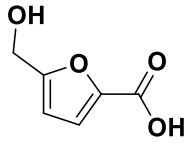
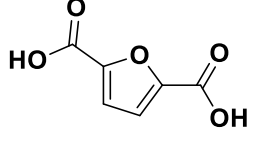
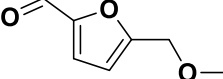
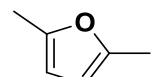
Préambule

La raréfaction des ressources fossiles ainsi que le changement climatique nous imposent un remodelage complet de notre mode de pensée et de production. Des pans entiers de notre société sont totalement revus et modifiés pour se réorienter vers des procédés plus écologiques et respectueux de notre planète. La science ne fait en aucun cas exception à ce changement de route, elle se doit de montrer l'exemple et être pionnière dans le domaine de l'innovation. La catalyse joue un rôle essentiel et actif dans le développement de notre société. En effet, plus de 80 % des produits manufacturés de notre quotidien ont vécu une étape de catalyse lors de leurs processus de création (textiles, engrais, pots catalytiques ou encore médicaments). Deux types de catalyse nous intéressent parmi les différents domaines catalytiques. Ainsi, nous avons la catalyse chimique hétérogène (utilisation de métaux supportés), qui est très versatile et peut fonctionner dans une large gamme de conditions (températures, solvants, pressions). Puis, nous avons la biocatalyse, qui elle, utilise des catalyseurs biosourcés (enzymes, microorganismes) dans des réactions en conditions douces (températures, pH et milieux aqueux). Ces procédés catalytiques utilisent traditionnellement un catalyseur unique. Cependant, cet emploi limite fortement le panel de réactions envisageables. Afin d'ouvrir de nouvelles voies réactionnelles, une combinaison de deux catalyseurs de nature différente est une des solutions envisagées. Effectivement, la « catalyse hybride » (ou catalyse chemoenzymatique) a connu un essor sans précédent au cours de ces 20 dernières années. Une augmentation croissante du nombre de publications rapportant des travaux de développement de la catalyse hybride de type « one-pot/one-step » (1P1S) est effectivement observée, avec 1 publication en 2005 et 6 en 2019 pour un total de 36 en décembre 2019.

Mon projet de thèse vise à valoriser une molécule issue de la biomasse : le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF, entrée 1, Tableau 1), en synthons d'origine biosourcée à haute valeur ajoutée au travers de la mise en œuvre de procédés hybrides. En tant que molécule plateforme, le HMF donne accès à différents produits aux applications variées (pharmaceutiques, bioénergie, polymères, cosmétiques...) selon les types de réactions¹⁻³. Par exemple, une étherification du HMF permet de synthétiser l'éthoxyméthylfurfural (EMF, entrée 6, Tableau 1). Cette molécule présente un potentiel élevé comme composants du carburant pour véhicules automobiles³⁻⁶. Ou encore, une oxydation de la fonction alcool du HMF permet d'obtenir le 2,5-dicarboxaldéhydefurane (DCAF, entrée 3, Tableau 1) qui s'est avéré être très intéressant comme matériel de départ pour des applications incluant les

fongicides et les produits pharmaceutiques ⁷. Un récapitulatif des principaux synthons issus de la transformation du HMF est disponible dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Valorisation du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) en 2,5-dihydroxyméthylfurane (DHMF), 2,5-dicarboxaldéhydefurane (DCAF), acide 5-hydroxyméthyl-2-furancarboxylique (HFCA), acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA), éthoxyméthylfurfural (EMF) et diméthylfurane (DMF).

Entrée	Structure	Acronyme	Applications
1		HMF	-
2		DHMF	Polyesters, polyuréthanes
3		DCAF	Fongicides, polymères, composés pharmaceutiques
4		HFCA	Polyesters
5		FDCA	Polyamides, polyester
6		EMF	Biodiesels
7		DMF	Biodiesels

L'acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA, entrée 5, Tableau 1) est une des molécules les plus recherchées, car sous forme polymérisée, ses propriétés se rapprochent du polyéthylène téréphtalate (PET, polymère utilisé pour la fabrication de produit en plastique) et du polytéréphtalate de butylène (PBT, polymère qui possède des propriétés thermoplastiques). Le FDCA s'est avéré être un substitut fiable à ses polymères d'origine pétrosourcée ⁷. La construction de nouveaux synthons à haute valeur ajoutée d'origine biosourcée (connus aussi sous la dénomination « building blocks ») pour la synthèse de nouveaux biopolymères s'illustre également avec la synthèse de structures qui incluent des fonctions amines. Ces dernières sont des précurseurs intéressants pour de nouveaux polymères biosourcés comme les polyamides, les polyimides, les polyaspartimides, les polyurées, les polyhydroxyuréthanes, les polyimines et polyenamines ⁸. Ainsi l'introduction de fonctions amines dans la structure du HMF mènerait à une catégorie de synthons appelés furfurylamines. Un des moyens les plus efficaces d'introduire cette fonction dans la structure du HMF est d'effectuer une réaction de transfert d'amine sur la fonction aldéhyde. Les transaminases qui font partie de la classe des transférases ⁹ permettent de venir substituer une fonction cétone par une fonction amine dans des conditions réactionnelles douces (pH neutre, température ambiante). Il s'agit de l'un des moyens les plus efficaces pour synthétiser des molécules avec des fonctions amines. Cependant, le fait d'effectuer une réaction de transfert d'amine seule sur le HMF mène uniquement à son équivalent aminé le 5-hydroxyméthylfurfurylamine (HMFA). Afin de pouvoir obtenir les différents blocs décrits dans le Schéma 1, une oxydation des fonctions alcools ou aldéhyde du HMF est nécessaire.

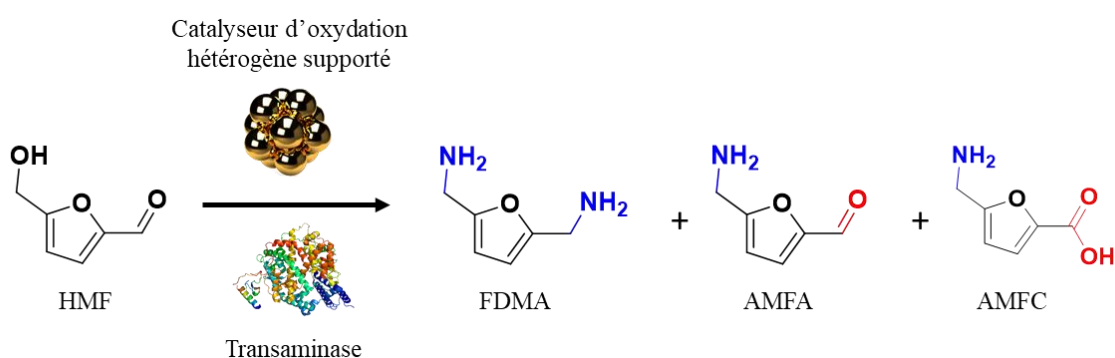


Schéma 1 : Schéma réactionnel général représentant le procédé hybride pour la valorisation directe du HMF en 2,5-diaminométhylfurane (FDMA), 5-aminométhylfurfural (AMFA) et acide 5-aminométhylfuranoïque (AMFC) au travers d'une combinaison de nanoparticules métalliques supportées et d'une transaminase.

Ainsi, le but du projet HybCat4Bio est de combiner l'utilisation des nanoparticules métalliques supportées pour des réactions d'oxydations et des transaminases pour des réactions de transferts d'amines pour **se diriger vers la synthèse directe de furfurylamines grâce au développement de procédés hybrides à partir du HMF**. Le procédé général est résumé dans le Schéma 1. La définition même d'un procédé hybride est l'utilisation de deux catalyseurs de nature différente dans un même réacteur ou même milieu réactionnel. Le fait de vouloir combiner ces deux types de catalyseur nous amène donc à mener une réflexion sur le type de catalyse hybride que nous voulons mettre en œuvre. Par conséquent, l'état de l'art du présent manuscrit se focalisera sur trois grandes parties.

La première analysera les différentes configurations mettant en œuvre des procédés catalytiques hybrides. Elle aura pour vocation de déterminer « **Quels sont les avantages et les limitations de telles configurations ?** ». La seconde partie présentera les voies de synthèse par catalyse hétérogène et biocatalytique des **furfurylamines** à partir du HMF en mettant en lumière les **conditions d'obtention de ces molécules**. La dernière partie présentera un état de l'art sur les **méthodes d'immobilisation des transaminases**, approche utilisée lors de mes travaux de thèse et qui a permis d'étudier la combinaison du biocatalyseur avec les nanoparticules métalliques supportées.

État de l’art

1 Contexte

Le principe de la catalyse hybride est d’associer deux catalyseurs de nature différente afin qu’ils travaillent ensemble. Ce nouveau type de synthèse suscite de plus en plus d’intérêt pour de nombreuses raisons. Depuis la formalisation du concept de « chimie verte » par *Anastas et Warner*¹⁰, les scientifiques ont cherché des synthèses alternatives plus efficaces, moins voraces en énergie, économiquement viables et plus respectueuses de l’environnement. Par exemple, la mise en œuvre de procédés hybrides permet de s’affranchir des étapes intermédiaires de purification des composés. Ou encore, l’utilisation d’un milieu réactionnel commun aux deux catalyseurs éviterait l’emploi de plusieurs solvants et l’application d’une seule source de chauffage. Cela permettrait également de synthétiser des produits chimiques à haute valeur ajoutée de manière plus efficace et durable. Pour que deux catalyseurs de nature complètement opposée fonctionnent dans un même pot réactionnel, un effet synergique et/ou complémentaire entre les deux catalyseurs est alors souhaitable. Cet effet réside dans le fonctionnement simultané des deux catalyseurs favorisés par la proximité de leurs sites actifs respectifs qui permet une diffusion optimale des substrats et intermédiaires réactionnels. Cela est possible uniquement si le milieu réactionnel offre des conditions adaptées pour chacune des deux réactions. Cette combinaison nécessite une compatibilité totale entre les catalyseurs en matière de conditions de fonctionnement, de réactifs impliqués dans la réaction, ainsi qu’en ce qui concerne la technologie de processus choisie pour exécuter la réaction¹¹. Cependant, de telles réactions produisent souvent un empoisonnement croisé des deux catalyseurs par leurs substrats et produits respectifs. Ainsi, nous verrons les avantages et inconvénients des différentes configurations de procédés hybrides afin de déterminer le procédé le plus adapté pour mettre à l’épreuve l’idée définie dans le préambule.

1.1 Procédés hybrides

Les procédés hybrides peuvent se définir selon plusieurs niveaux d’intégration qui répondent eux-mêmes à différentes problématiques. Heuson *et al.*¹² ont défini quatre grandes catégories qui recouvrent les différents types de procédés hybrides présents dans la littérature (entrée 2 à 5, Tableau 2).

Tableau 2 : Récapitulatif des différents niveaux d’intégration des procédés hybrides issus de Heuson *et al.* ¹²

Entrée	Procédé hybride	Schéma
1	two-pots/two-steps: 2P2S	
2	two-pots/one-step: 2P1S	
3	one-pot/two-steps: 1P2S	
4	one-pot/one-step: 1P1S	
5	Matériaux multicatalytiques hybrides : MMCH	

Seul le procédé 2P2S (entrée 1, Tableau 2) correspond à une cascade réactionnelle classique et n’entre pas dans la catégorie des procédés hybrides. Dans ce cas, une purification

(ou isolement) du produit intermédiaire est nécessaire avant de promouvoir l’action du second catalyseur. Ce type de synthèse nécessite l’utilisation de plusieurs milieux réactionnels. Ce genre de cascade ne correspond pas aux critères recherchés dans l’objectif de ma thèse et ne sera donc pas étudié. Les procédés 1P1S (entrée 4, Tableau 2) sont ceux qui sont les plus complexes à mettre en œuvre, car ils présentent de nombreux verrous (inhibition inter catalyseurs et par les substrats et produits de réactions, milieux réactionnels de nature très différente pour chaque catalyseur...). Ainsi, des alternatives traduites par les procédés 2P1S et 1P2S (entrée 2 et 3, Tableau 2) ont été mises au point.

1.2 Procédé hybride 2P1S

Le premier niveau d’intégration correspond aux procédés « two-pots/one-step » (2P1S, entrée 2, Tableau 2) où les deux catalyseurs opèrent dans un même réacteur, mais dans deux milieux réactionnels différents grâce à la présence d’une interface solide, telle qu’une membrane, ou liquide (Figure 1). Un procédé de ce type pourrait nous être avantageux. Effectivement, les nanoparticules métalliques supportées utilisées pour des réactions d’oxydation en phase liquide nécessitent généralement un solvant organique. A contrario, les transaminases fonctionnent en milieux aqueux.

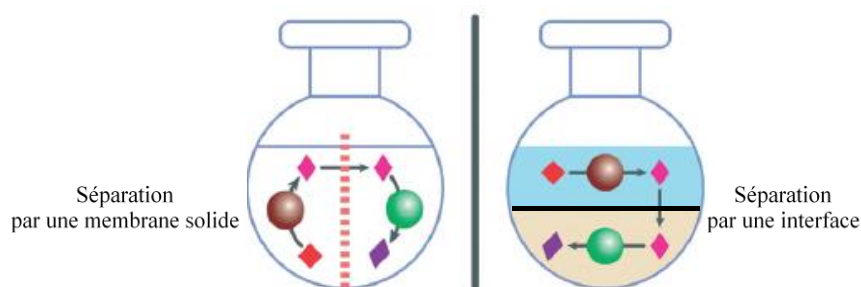


Figure 1 : Schéma explicatif du procédé hybride 2P1S issu de Heuson *et al.* ¹²

La clé dans ce genre de procédé est l’utilisation d’une interface sélective qui évite un empoisonnement croisé entre catalyseurs. Deux milieux réactionnels différents, séparés par une interface solide (membrane poreuse) ou liquide par laquelle diffusent les substrats, pourraient

être une solution en vue de la mise en œuvre d’un procédé hybride pour la production directe de furfurylamines à partir de HMF.

1.2.1 Synthèse bicompartimentée : Séparation solide

L’un des principaux avantages d’un procédé 2P1S, grâce à l’utilisation d’une membrane poreuse, concerne l’évitement d’un empoisonnement mutuel des deux catalyseurs. Cela peut également permettre l’isolement direct des produits de réaction. Enfin, la compartimentation des phases permet une modulation propre de chaque milieu réactionnel où chaque type de catalyse a lieu. Plusieurs exemples de mise en œuvre de procédés hybrides 2P1S sont présents dans la littérature ^{13–20}. Sato *et al.* ²¹ ont combiné une oxydation de Wecker (utilisation d’un catalyseur CuCl/PdCl₂) dans un milieu aqueux H₂O/MeOH (7/1, v/v) et une réduction enzymatique (utilisation d’une alcool déshydrogénase) dans un milieu tamponné/isopropanol (3/1, v/v) dans l’optique de synthétiser de manière énantiosélective le composé 1-phényléthanol. Le catalyseur CuCl/PdCl₂ prend en charge l’oxydation du styrène en acétophénone. Or les ions cuivre inhibent l’activité de l’alcool déshydrogénase lorsque les deux catalyseurs sont présents dans le même milieu réactionnel, ce qui empêche la conversion enzymatique en 1-phényléthanol (Schéma 2).

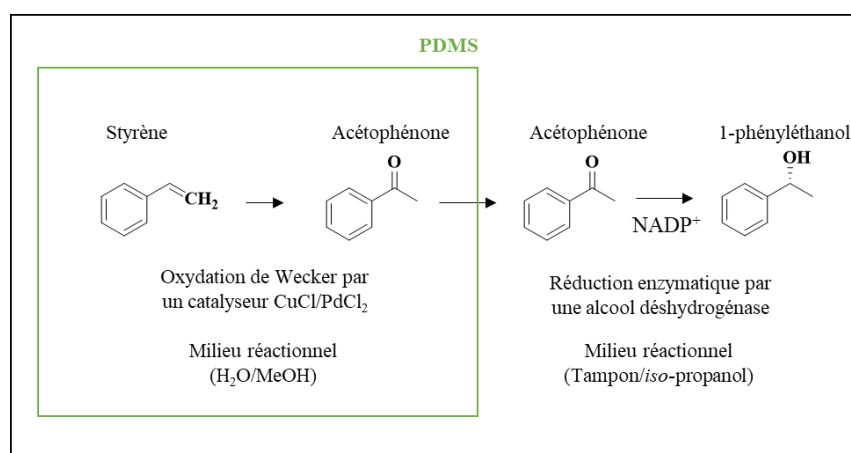


Schéma 2 : Schéma général réactionnel du procédé hybride 2P1S mis au point par Sato *et al.* ²¹ pour la synthèse directe de 1-phényléthanol à partir de styrène.

Afin de parer à ce problème, les auteurs ont utilisé une membrane de polydiméthylsiloxane (PDMS) (adapté du travail de Runge *et al.* ²²) pour séparer les deux milieux réactionnels (H₂O/MeOH pour l’oxydation et tampon/isopropanol pour la partie enzymatique). Les propriétés hydrophobes de la membrane permettent à l’acétophénone formé

de passer du milieu de réaction d’oxydation de la première étape au milieu tamponné pour être réduite de manière enzymatique. L’inhibition du biocatalyseur par les ions cuivre est alors évitée due à l’incapacité de ces derniers à traverser la membrane. Dans ce type de procédé 2P1S, les composés sont formés dans un seul « pot » réactionnel et il n’est pas nécessaire de purifier le composé intermédiaire acétophénone. Cependant, le fait d’avoir une membrane directement au contact des deux phases liquides peut mener à différents problèmes. Dans l’exemple présenté ci-dessus, les auteurs ont pu constater une fuite du solvant (MeOH) de la partie oxydative dans le milieu réactionnel avec l’enzyme, ce qui menait à des rendements moins importants en cétone. Ainsi ils se sont vus obligés d’ajouter le milieu réactionnel contenant l’enzyme, une fois l’oxydation de Wecker complète. D’autres exemples d’application qui utilisent des membranes de PDMS sont disponibles dans la littérature ^{23–25}.

Nous avons donc pu constater que l’utilisation d’une membrane permettait de limiter les phénomènes d’inhibition entre catalyseurs. Cette même membrane a été utilisée pour la synthèse de composés aminés énantiomériquement purs au travers de l’utilisation d’une transaminase (Schaaf *et al.* ²⁶, Schéma 3). Les auteurs ont proposé un réacteur biphasique séparé par une membrane de PDMS où une réaction de couplage carbone-carbone est effectuée par un catalyseur homogène au Pd. La cétone obtenue passe à travers la membrane et est convertie par une transaminase pour donner l’amine énantiomériquement pure correspondante.

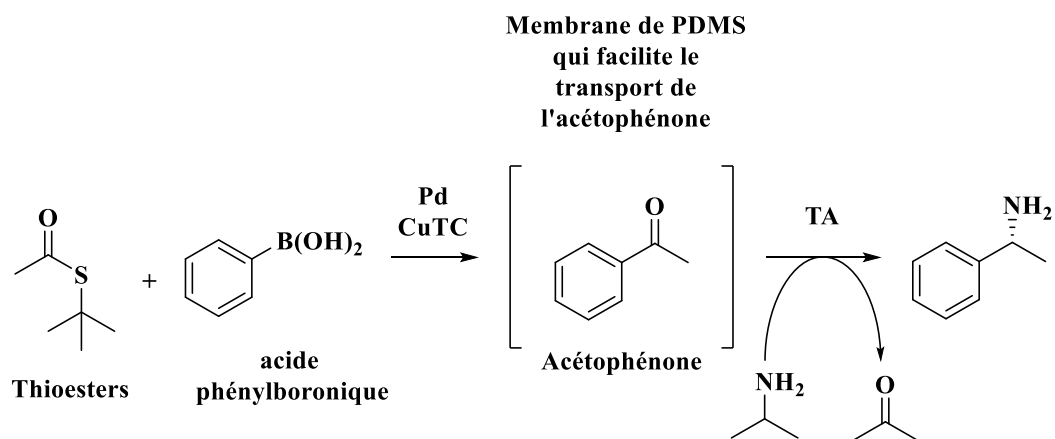


Schéma 3 : Schéma général réactionnel du procédé hybride 2P1S mis au point par Schaaf *et al.* ²⁶ pour la synthèse directe et énantiomériquement pure de composés aminés optiquement purs.

Initialement la réaction de couplage était effectuée dans un solvant apolaire (heptane). Cependant, les auteurs ont pu constater une dégradation de la membrane due à l’utilisation de ce solvant apolaire, ce qui les a poussés à moduler le premier milieu réactionnel, c’est-à-dire la

réaction de couplage. Cette modulation a eu pour conséquence de diminuer le rendement en cétone de 99 % à 78 %.

La compartimentation des deux milieux réactionnels a permis aux auteurs de récupérer facilement et indépendamment les deux phases liquides, et donc de facto, les produits aminés souhaités. Cependant, l’utilisation d’une membrane PDMS, malgré les différents avantages conséquents, ne sont pas sélective des molécules qui diffuse à travers la membrane. Effectivement, les membranes de PDMS facilitent le transport des molécules hydrophobes. Ainsi même si cela empêche une inhibition des catalyseurs enzymatiques par le catalyseur au palladium (qui ne peut pas passer la membrane), les produits inerrants à la réaction de couplage (acide phénylboronique par exemple) initial non converti peuvent potentiellement traverser la membrane et parasiter la seconde réaction. Cela a progressivement mené à une baisse du pH du milieu réactionnel enzymatique et donc une inactivation de l’enzyme. En conclusion, la tolérance de la membrane peut limiter la modulation des milieux réactionnels. La fragilité de ces membranes n’en fait pas une solution idéale pour le développement de notre procédé hybride. De plus, la non-sélectivité de la membrane vis-à-vis des molécules est également un problème. Une alternative est l’utilisation de deux catalyseurs en tandem dans des compartiments différents reliés par un pont liquide (membrane liquide) ^{19,21,26-29}.

1.2.2 Synthèse bi-compartimentée : séparation liquide

Dans ce type de procédé, un transporteur peut être utilisé pour transférer de manière spécifique le produit intermédiaire entre deux compartiments contenant un milieu réactionnel spécifique aux deux catalyseurs utilisés. Dans ce cas, il y a nécessité de maîtriser chaque milieu réactionnel pour favoriser le transfert du produit intermédiaire. Similairement à l’utilisation d’une membrane, ce type système présente tout d’abord l’avantage de permettre une récupération aisée du produit final. Gimbernat *et al.* ont récemment décrit un système 2P1S pour la production de HMF à partir de D-glucose dans un réacteur multi-compartiment ²⁷ (Figure 2). Ils ont mis à profit la combinaison d’une glucose isomérase immobilisée (la Sweetzyme[®]) et d’un catalyseur acide (Amberlyst 15), pour convertir le D-glucose en D-fructose dans une première phase aqueuse dite « donneuse » puis pour convertir le D-fructose en HMF dans une seconde phase aqueuse dite « réceptrice ». Les deux phases aqueuses étaient séparées par une phase liquide organique insoluble dans l’eau, le méthylisobutylcétone (MIBK) tandis que le D-

fructose formé dans la phase donneuse était extrait puis transporté grâce à un complexe formé par l’aryle boronique 3,5-DCPBA et l’Aliquat336, un sel d’ammonium quaternaire. Ce procédé a permis une synthèse directe du HMF sans isolement de l’intermédiaire D-fructose. De plus, dans la mesure où l’aryle boronique 3,5-DCPBA était sélectif du D-fructose et non du D-glucose, le transfert facilité du D-fructose limitait les molécules indésirables dans la phase aqueuse réceptrice. Les auteurs ont ainsi atteint un rendement d’extraction en D-fructose de 55,3 % sur 70,1 % de D-glucose isomérisé avec un rendement final en HMF de 4,1 %.

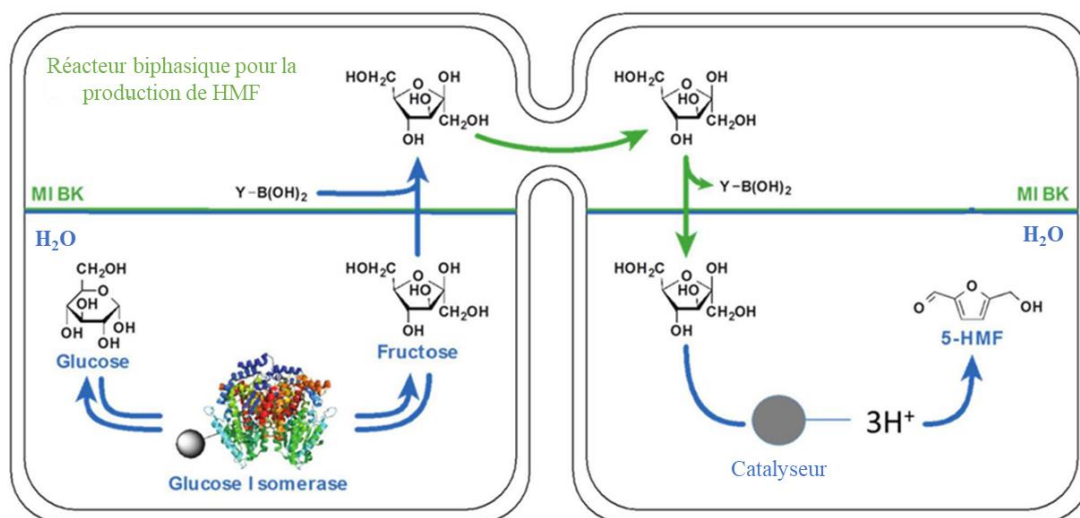


Figure 2 : Schéma du procédé hybride 2P1S issu des travaux de Gimbernat *et al.* ²⁷ pour la production directe de HMF à partir de D-glucose.

Une manière d’augmenter le rendement d’extraction du fructose serait d’adapter les travaux de Draffin *et al.* ³⁰. Ces auteurs ont synthétisé un acide boronique hautement lipophile (Figure 3) qui permet un transport plus efficace des sucres (fructose et glucose) à travers les membranes organiques liquides supportés (*o*-nitrophenyloctyl ether supporté sur du polypropylène poreux par exemple).

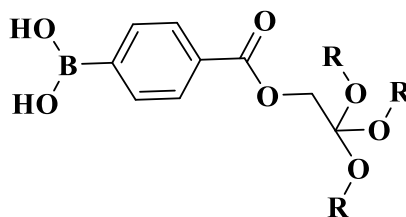


Figure 3 : Structure d’un acide boronique lipophile désigné par Draffin *et al.* ³⁰ pour le transport amélioré des sucres au travers des membranes liquides supportées.

Contrairement à l’acide boronique utilisé par Gimbernat *et al.*, le transporteur pourrait potentiellement transporter deux molécules de D-fructose à la fois (selon les calculs de modélisation effectués). Il augmenterait donc le rendement de D-fructose extrait de la phase aqueuse donneuse (Figure 2) et ainsi le rendement en HMF. Le travail sur la structure des molécules permettant un transport sélectif de certains sucres représente donc une piste très intéressante pour l’amélioration des procédés hybrides de types 2P1S.

En conclusion, les procédés 2P1S, ou synthèse multi-compartmentée, apportent une solution efficace aux problèmes d’inhibition dus à d’empoisonnement mutuel (travail de Sato *et al.*²¹) des catalyseurs (système membranaire). Cependant des problèmes de limitation et de diffusion de substrats entre les différents milieux réactionnels peuvent apparaître (travail de Schaaf *et al.*²⁶), ce qui entraîne des rendements moins importants pour les produits finaux. De plus en fonction des milieux réactionnels utilisés, une dégradation de la membrane peut être observée. Une solution pour parer à ces problèmes de rendement est la mise au point de procédé 1P2S. Dans ce cas-ci, une barrière temporelle sépare l’utilisation des deux catalyseurs.

1.3 Procédés 1P2S et 1P1S

1.3.1 Procédé 1P2S

Dans les procédés hybrides 1P2S, l’ajout du second catalyseur est uniquement effectué une fois que la première réaction catalytique est à atteint son rendement maximal possible en produit intermédiaire désiré. Le principe de ce type de procédé est résumé en Figure 4. Les avantages sont une mise en œuvre dans un seul réacteur et une économie d’énergie due à l’utilisation d’un seul milieu réactionnel et par conséquent d’une seule source de chauffage. D’autre part, l’ajout du second catalyseur permet la transformation directe de l’intermédiaire désiré, et potentiellement compliqué à isoler, ce qui a pour conséquence le contrôle du rendement en produit final. Une des limitations principales est la temporalité. Effectivement, ce type de procédé est limité par la cinétique de la première réaction. Un autre challenge des procédés 1P2S est de trouver des catalyseurs qui peuvent opérer de façon efficace dans des conditions réactionnelles similaires³¹⁻³⁷.

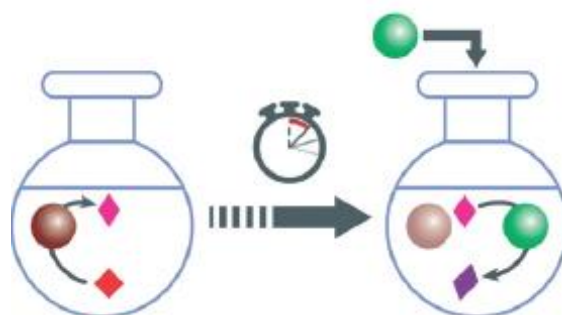


Figure 4 : Schéma explicatif du procédé hybride 1P2S issu de Heuson *et al.* ⁽⁷⁾

Les exemples de procédés hybrides 1P2S sont particulièrement décrits dans la synthèse de composés pharmaceutiques ³⁸ avec des études qui concernent notamment la recherche de conditions réactionnelles similaires. Par exemple avec le travail de Burda *et al.* ³⁹. Dans cet exemple les auteurs ont choisi un catalyseur hétérogène au palladium pour coupler un acide boronique (molécule 2, Schéma 4) et un composé cétone (molécule 1, Schéma 4) dans un milieu aqueux au travers d'un couplage de Suzuki. Une fois le composé intermédiaire formé, il est transformé au travers d'une réaction de réduction asymétrique (molécule 4, Schéma 4) grâce à l'alcool déshydrogénase (ADH, *Rhodococcus sp.*), pour la synthèse d'alcools énantiomériques purs. Le procédé est représenté dans le Schéma 4.

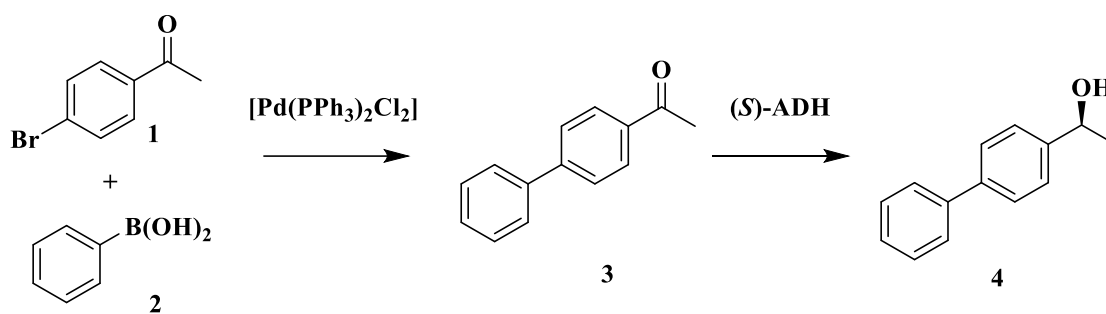


Schéma 4 : Représentation du procédé hybride 1P2S adapté de Burda *et al.* ³⁹ pour la synthèse énantiosélective d'alcool optiquement pur *via* une catalyse au palladium couplée à une alcool déshydrogénase (ADH).

Les auteurs ont d'abord essayé un procédé 1P2S avec un ajustement du pH à 7 avant d'initier la partie biocatalytique, qui a donné seulement 44 % de conversion (ee >99%). Après investigation des différents paramètres qui peuvent expliquer ce rendement, il s'est avéré que l'activité enzymatique était impactée, non pas par le catalyseur au palladium en lui-même, mais par son ligand phosphane nécessaire à la réaction de couplage. Effectivement, une concentration

de 4 mM de ligands a mené à une perte d'activité enzymatique de 44 %. De plus, seulement 14 % de l'activité enzymatique initiale étaient retrouvés en présence d'un excès d'acide phénylboronique. Trois paramètres furent donc adaptés pour permettre la réduction dans le même milieu réactionnel : pas d'ajout de ligands phosphane, l'acide boronique utilisé ne doit pas être en excès et sa conversion doit être complète. Ces compromis ont mené à la mise au point d'un procédé hybride 1P2S avec une conversion finale de 91 % du substrat initial et un excès énantiomérique (ee) >99 % de l'alcool. Le rendement final obtenu lors du procédé 1P2S était similaire à celui du procédé 2P2S (respectivement 91 et 93 %). La modulation et l'adaptation d'une des deux étapes aux conditions de la première ont donc permis aux auteurs de développer leur procédé 1P2S, évitant ainsi l'isolement du composé intermédiaire (pour sa conversion directe. La mise au point d'un procédé 1P2S passe donc par l'adaptation d'une des deux étapes aux conditions opératoires de l'étape suivante. Cet exemple illustre une des forces du procédé 1P2S, où chaque étape peut être modulée indépendamment en fonction de l'inhibition subie par un des deux catalyseurs dans le milieu réactionnel.

Il est également possible de moduler la nature du milieu réactionnel afin qu'il convienne directement aux deux catalyseurs. Paris *et al.*⁴⁰ ont utilisé des transaminases en réaction 1P2S. Dans ce travail, un couplage de Suzuki, catalysé par un catalyseur au palladium ($\text{PdCl}_2/\text{TPPTS}$) était effectué pour synthétiser une molécule biaryl (Schéma 5) qui était ensuite converti en amine, grâce à une transaminase.

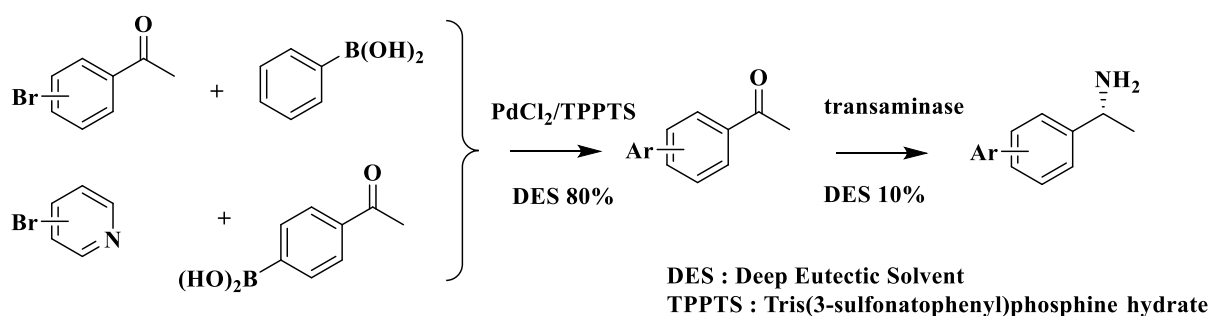


Schéma 5 : Représentation du procédé hybride 1P2S adapté de Paris *et al.*⁴⁰ pour la synthèse énantiosélective d'amine grâce au couplage d'une catalyse hétérogène au palladium et d'une transaminase.

Pour cette étude les auteurs ont testé une gamme de transaminases (TAs, *Chromobacterium violaceum* (Cv), (*S*)-*Arthrobacter* (ArS) et la (*R*)-sélective ATAs de (*R*) - *Arthrobacter* (ArR) ainsi qu'une gamme d'enzyme commercial (Codexis). Ils ont utilisé un

milieu réactionnel constitué d’un mélange de tampons (tampon phosphate) et de solvants eutectiques profonds (DES pour Deep Eutectic Solvents). L’utilisation de DES a permis une meilleure solubilisation des réactifs (acide boronique notamment), ce qui a induit une quantité de produits transformés supérieure lors de la réaction de Suzuki.

Cependant, si la concentration en réactif (acide boronique pour la réaction de couplage) a pu être augmentée jusqu’à 200 mM pour la réaction de Suzuki, la seconde étape enzymatique a démontré son efficacité uniquement jusqu’à 75 mM. Pour obtenir des rendements >90 %, la réaction de Suzuki a nécessité des teneurs en DES au moins égales à 50 % tandis que l’activité enzymatique était impactée au-delà de 15 % de DES dans le milieu réactionnel. Au vu de ces résultats, les auteurs ont donc développé un procédé où la réaction de Suzuki a lieu dans un solvant contenant 80 % de DES et 200 mM de réactifs initiaux. Une fois la conversion complète validée, le milieu réactionnel est dilué jusqu’à une concentration de 25 mM finale et pour un pourcentage de 10 % de DES pour permettre la réalisation de la réaction enzymatique (Schéma 5).

Ce procédé hybride 1P2S a abouti à la synthèse de plusieurs composés biarylamines avec des conversions >99 %. Cet exemple démontre que le travail d’adaptation des conditions réactionnelles peut être effectué en fonction des capacités de conversion du catalyseur métallique contrairement au travail de Burda *et al.*³⁹ qui ont proposé un travail d’adaptation par rapport aux conditions de fonctionnement du biocatalyseur.

Dans le cas où l’implémentation d’un procédé 1P2S ne peut pas passer par une modulation des milieux réactionnels, car les activités catalytiques des deux catalyseurs sont trop faibles ou inexistantes dans les conditions de l’autre, une des solutions est de venir protéger un des deux catalyseurs. Le Schéma 6 présente la réaction mise au point par Sand et Weberskirch pour la synthèse directe d’aldéhyde en partant d’un ester. Ici, une lipase (*Candida antarctica*, CAL-B) permet d’hydrolyser un ester en milieux aqueux qui est ensuite oxydé par une micelle composée de bipyridine fonctionnalisée avec le composé servant de support à un métal (ici le cuivre)⁴¹ de transitions pour catalyser l’oxydation en aérobie d’alcool primaire en milieu aqueux⁴².

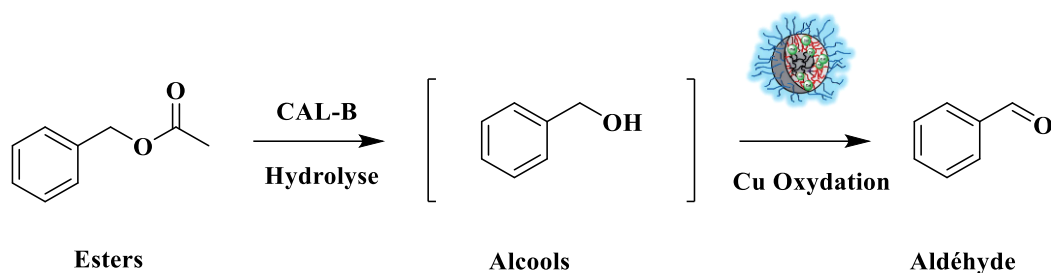


Schéma 6 : Représentation du procédé hybride 1P2S adapté de Sand *et al.*⁴² pour la synthèse d'aldéhyde à partir d'ester grâce à la combinaison d'une lipase et de nanoparticules de cuivre.

Ici, la micelle permet la compartimentation du cuivre et prévient les interactions qui mènent à une inhibition de l'enzyme par le cuivre. La lipase CAL-B (en milieu aqueux) permet donc d'hydrolyser les esters. L'alcool formé diffuse ensuite de l'extérieur de la micelle (hydrophile) vers le cœur du nano réacteur micellaire pour être oxydé par le complexe de cuivre. Le procédé s'apparente à un procédé hybride 1P2S, car les micelles qui contiennent le complexe de cuivre sont ajoutées au milieu réactionnel seulement après neutralisation de l'acide résultant de l'hydrolyse de l'ester et après la confirmation de la formation de l'alcool. Ainsi, l'utilisation du second catalyseur, emprisonné dans le nanoréacteur micellaire, permet d'effectuer une cascade catalytique dans un même milieu réactionnel.

Pour conclure, les exemples présentés montrent que les procédés hybrides 1P2S peuvent être développés en fonction de la compatibilité des milieux réactionnels avec les catalyseurs. D'une part, ils permettent d'adapter indépendamment les milieux réactionnels pour permettre une efficacité maximale de chaque étape catalytique. D'autre part, si une adaptation des milieux réactionnels n'est pas possible, une protection de l'un des deux catalyseurs peut être envisagée pour le rendre applicable dans le milieu de l'autre catalyseur.

1.3.2 Procédé 1P1S

L'entrée 4 du Tableau 2 et la Figure 6 présentent le procédé 1P1S où les deux catalyseurs sont présents dès le début de la réaction dans le même milieu réactionnel pour la synthèse directe du produit. Contrairement aux procédés 2P1S, ce type de mise en œuvre ne nécessite pas l'utilisation de deux phases réactionnelles. Et, contrairement aux procédés 1P2S, aucune action d'ajout du second catalyseur n'est nécessaire au cours du procédé. Cependant, le fait de pouvoir combiner deux catalyseurs dans un seul et même milieu réactionnel implique une coopération totale entre les deux catalyseurs. Cette compatibilité peut mener à une synergie potentielle due à la proximité des sites actifs. Cependant, l'optimisation de tous ces différents

paramètres (températures, solvant, concentration des réactifs) implique une flexibilité moins importante dans le choix des catalyseurs et un risque d’incompatibilité plus élevé entre les deux catalyseurs. Ce procédé permet une potentielle synergie entre les catalyseurs, ce qui peut mener à un déplacement de l’équilibre de la réaction. Par exemple, en combinant une réaction thermodynamiquement irréversible à une réaction équilibrée en une seule étape, l’équilibre général est déplacé en faveur du produit souhaité (Figure 5).

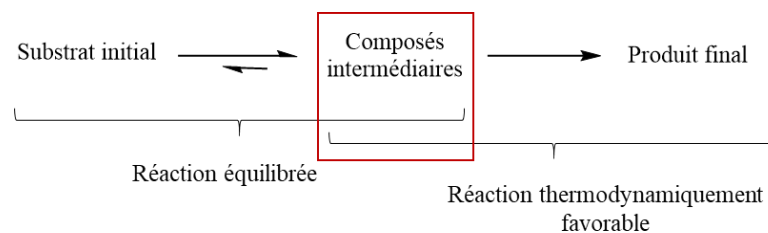


Figure 5 : Représentation générale d’une combinaison de réaction équilibrée et thermodynamiquement favorable.

Comme illustré en Figure 5, une telle combinaison permettrait de favoriser la formation du composé intermédiaire grâce à la seconde réaction qui permet de « tirer » l’équilibre dans le sens désiré. Ainsi, si les différents problèmes inhérents aux procédés hybrides (milieux réactionnels communs, inhibition mutuelle) sont résolus, cela permettrait un accès facilité à de nombreuses molécules. Les premiers exemples de ce type de mise en œuvre (1P1S) ont été développés entre les années 1980 à 2000. En décembre 2019, 36 publications faisaient état de la mise au point d’un procédé hybride 1P1S ⁴³.

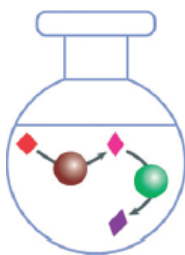


Figure 6 : Représentation schématique d’un procédé hybride 1P1S issu de Heuson *et al.* ¹²

Lors du développement des procédés hybrides 1P1S, l’un des challenges est de trouver des conditions réactionnelles qui soient adaptées aux catalyseurs utilisés. Par exemple, Mutti *et al.* ⁴⁴ ont combiné un catalyseur à l’iridium pour l’oxydation d’alcools racémiques suivie par une réduction asymétrique catalysée par une alcool déshydrogénase dans le but d’obtenir des alcools optiquement purs (Schéma 7). Les auteurs ont dû chercher un accepteur d’hydrogène spécifique au catalyseur métallique, mais pas de l’enzyme et un système de réduction qui n’interfère pas avec l’étape d’oxydation.

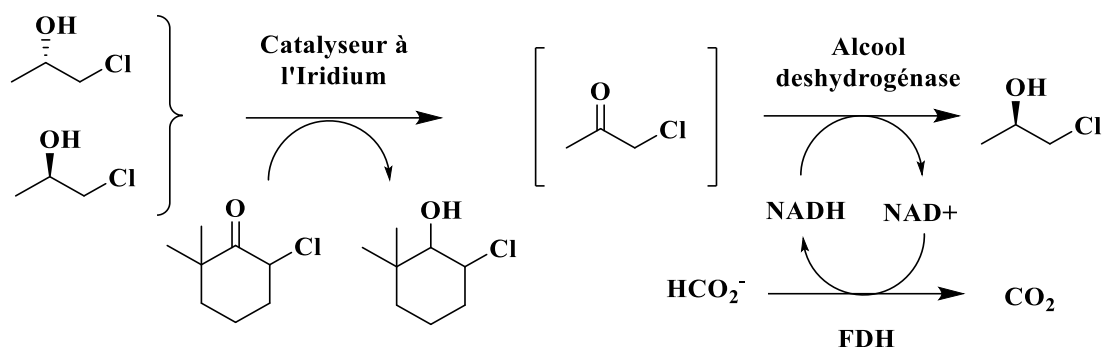


Schéma 7 : Schéma réactionnel du travail effectué par Mutti *et al.* ⁽⁵⁰⁾ pour la synthèse directe d'alcools optiquement purs dans un procédé hybride 1P1S combinant un catalyseur hétérogène à l'iridium et une alcool déshydrogénase.

Ces derniers ont trouvé les paramètres qui permettent aux deux réactions du procédé hybride 1P1S de fonctionner dans le même milieu réactionnel. Ils ont également inclus une étape enzymatique avec la formate déshydrogénase pour régénérer le NADH, cofacteur nécessaire à la réduction de l'intermédiaire cétonique catalysée par l'alcool déshydrogénase. Cette combinaison de trois catalyseurs leur a permis d'obtenir un rendement en alcool > 99 % et < 0,1 % concernant la cétone intermédiaire. Ce procédé hybride a donc permis la synthèse d'une molécule pure à partir d'un mélange racémique avec un excès énantiomérique de 40 % obtenu dans les meilleures conditions.

Un autre exemple de résolution d'un mélange racémique est le travail de Rios-Lombarda *et al.* ⁴⁵. Un catalyseur au ruthénium a permis une isomérisation d'un composé alcène en cétone qui est ensuite réduite par une oxydoréductase pour générer l'alcool désiré (Schéma 8), le tout en procédé 1P1S.

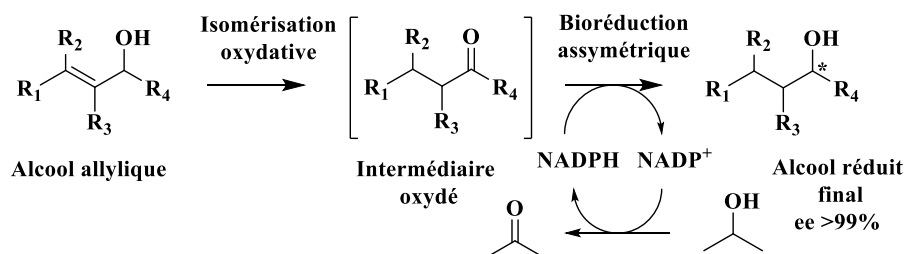


Schéma 8 : Schéma réactionnel du travail effectué par Rios-Lombarda *et al.* ⁴⁵ pour la synthèse directe d'alcools optiquement purs à partir d'un mélange racémique dans un procédé hybride 1P1S combinant un catalyseur au ruthénium et une oxydoréductase.

Les auteurs avaient déjà reporté une cascade catalytique combinant un complexe de ruthénium et une transaminase pour la synthèse de composés aminés optiquement purs ⁴⁶. Ils avaient observé une inhibition du complexe de ruthénium par l’enzyme ce qui les a conduits à la mise au point d’un procédé en deux étapes. En étudiant les deux étapes séparément et en présence d’autres catalyseurs, les auteurs ont démontré qu’aucune inhibition significative n’était observée de la part des deux catalyseurs. En conséquence, une synthèse où les deux catalyseurs étaient présents dès le début de la réaction a pu être mise au point. Les rendements du procédé en 1P2S étaient plus élevés (compris entre 86 et 90 %) que ceux obtenus dans le procédé 1P1S (compris entre 60 et 85 %). Cependant, là où le procédé 1P2S nécessitait de chauffer à 50 °C pour la première étape (isomérisation oxydative de l’alcool), les auteurs ont réussi à mettre au point le procédé 1P1S avec une température globale de 30 °C le tout en 24h de réaction contre un temps supérieur à 24 h pour le procédé 1P1S. La combinaison des deux catalyseurs permet de tirer la réaction vers les alcools énantiomériquement purs durant tout le temps où le biocatalyseur est actif. Une des explications possibles pour expliquer la différence de rendements est la désactivation prématurée du catalyseur enzymatique ce qui ne permet pas de dépasser un rendement final de 85 %.

Ces exemples démontrent que la mise au point de procédés 1P1S peut s’effectuer en ajustant les paramètres du milieu réactionnel ou en modifiant la nature des catalyseurs. Une autre méthode élégante qui permet de parer aux différents problèmes d’inhibition est la compartimentation des catalyseurs au sein du même milieu réactionnel, telle que le développement de nanoréacteurs micellaires qui contiennent l’un des deux catalyseurs ⁴⁷. La compartimentation a également permis la combinaison d’un biocatalyseur avec une métalloenzyme artificielle ⁴⁸, ou encore la synthèse en quantité conséquente d’une molécule pharmaceutique ⁴⁹. Les exemples de procédés hybrides présentés nous ont montré que ces derniers permettaient une synthèse rapide, simple et efficace de composés à haute valeur ajoutée, comme la synthèse de composés optiquement purs à partir d’un mélange racémique.

1.4 Procédés Hybrides avec des cellules entières

La catalyse hybride peut également employer des cellules complètes contenant le biocatalyseur. En plus d’éviter des étapes de lyses et de purification enzymatique, le fait de conserver l’enzyme à l’intérieur des cellules lui permet d’obtenir une protection vis-à-vis de l’environnement extérieur grâce à la membrane cellulaire. Par exemple *Xu et al*⁵⁰ ont combiné une réaction photocatalytique avec des cellules entières pour la synthèse d’alcools chiraux. Les auteurs ont pu obtenir un rendement en alcools de 93 % avec un ee > 99 %. La réaction est décrite dans le Schéma 9.

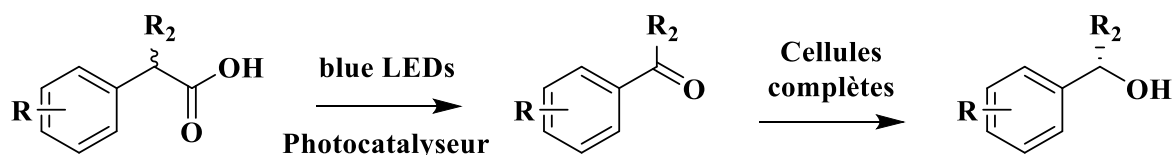


Schéma 9 : Schéma réactionnel du travail effectué par *Xu et al.*⁵⁰ pour la synthèse d’alcools optiquement purs dans un procédé hybride 1P1S combinant un photocatalyseur et des cellules complètes.

Afin de mettre au point une telle cascade, les auteurs ont dû sélectionner un système photocatalytique capable d’effectuer une carbonylation décarboxylative en milieux aqueux pour que ce système soit compatible avec la réduction asymétrique qui suit. Les auteurs ont donc opté pour un système combinant un photocatalyseur (permettant la formation d’un intermédiaire radical benzylique sous lumière LEDs) pour la décarboxylation du substrat initial puis son oxydation en cétone. Avant de mettre en œuvre le procédé 1P1S, les auteurs ont testé la réaction de réduction asymétrique avec une carbonyle réductase (*Kluyveromyces thermotolerans*, *Kt-CR*). Malgré des rendements importants (90 %) avec des ee > 99 %, l’ajout considérable de cofacteur (NADPH) ne rendait pas le procédé viable pour une future application industrielle. Les auteurs ont donc essayé d’ajouter directement le milieu de culture enzymatique de la *Kt-CR*. Ils ont donc pu constater que l’intermédiaire (Schéma 9) était assez hydrophobe pour traverser la membrane cellulaire et ainsi donner un rendement de 92 % (ee > 99 %) lors de la réduction asymétrique avec les cellules entières. De plus, le fait d’utiliser des cellules entières a donc permis de mettre en place un recyclage intracellulaire du NADPH, ce qui a supprimé l’ajout extérieur de ce cofacteur dans le milieu réactionnel. De ce fait, en plus d’économie d’énergie et de temps, ce procédé procure également une économie sur l’utilisation de réactifs.

Cependant, après avoir mis en œuvre un procédé 1P1S, les auteurs ont constaté une forte inhibition du procédé en général. Ils ont donc émis l'hypothèse que l'alcool formé était réoxydé sous l'influence du photo catalyseur (Figure 7).

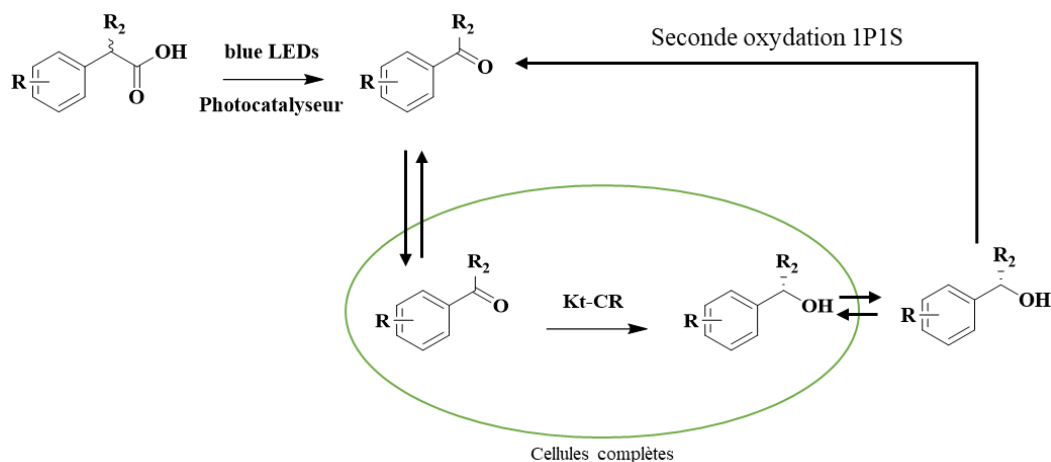


Figure 7 : Représentation du procédé 1P1S mis en place par Xu *et al.*⁵⁰

Les auteurs ont donc effectué un procédé 1P2S avec l'ajout des cellules complètes contenant la *Kt-CR* une fois la conversion complète du substrat initial validé. Ce procédé les a menés à des rendements de 85 % pour le composé présenté dans l'exemple avec un excès énantiomérique de 99 %.

Sirasani *et al.*⁵¹ ont combiné des cellules modifiées d'*E. coli* capables de produire de manière accrue du dihydrogène qui était ensuite utilisé avec un catalyseur métallique biocompatible pour une hydrogénation directe d'alcènes. Un résumé de leur étude est disponible en Figure 8. Le travail des auteurs s'est focalisé sur la sélection d'un métal de transition biocompatible avec les cellules génétiquement modifiées de *E. coli*. Finalement un catalyseur au palladium supporté sur PEI/silice gel a été sélectionné. Après des tests sur une quinzaine de substrats avec des rendements variés de 71 à 92 %, les auteurs ont pu conclure que ce procédé était viable pour des réactions directes d'hydrogénation combinant des cellules d'*E. coli* modifiées et un catalyseur métallique biocompatible.

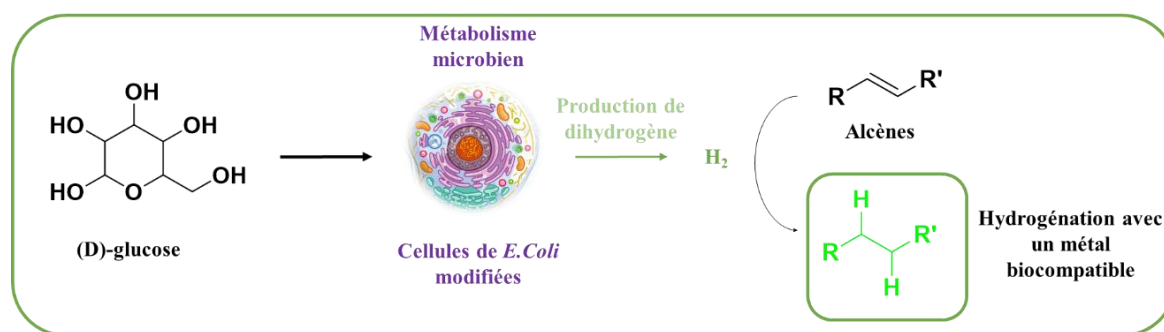


Figure 8 : Schéma récapitulatif du travail de Sirascini *et al.*⁵¹ pour des réactions d’hydrogénation d’alcènes dans un procédé hybride 1P1S combinant des cellules d’*E. coli* et un métal biocompatible.

D’autres exemples de catalyse hybride comprenant des cellules entières sont disponibles dans la littérature.^{52,53,53(53)} Une autre manière de protéger les catalyseurs contre des conditions extérieures non favorables est l’utilisation d’une coquille protectrice sous forme de micelles. Il existe également des systèmes d’encapsulation complète de l’un des deux catalyseurs pour parer à tout empoisonnement potentiel entre les deux entités.^{54,55}

Le domaine de la « catalyse hybride » apparaît donc comme une solution innovante pour les procédés 1P1S⁵⁶. Ainsi l’ouverture vers la combinaison avec d’autres types de catalyse se concrétise de plus en plus.^{15,16,56} La catalyse hétérogène et la biocatalyse supportée peuvent également être combinées avantageusement. Le premier exemple a été reporté en 1980 avec la combinaison d’une glucose isomérase et d’un Pt/C appliquée à la préparation du D-mannitol^{57–61}. L’approche de la catalyse hybride hétérogène simplifie énormément le processus de séparation des catalyseurs du milieu réactionnel. En effet dans ce cas les catalyseurs peuvent être séparés par simple filtration ou centrifugation. À ce jour seulement une quinzaine de publications font état de procédé 1P1S combinant deux catalyseurs supportés sur différents supports pour la mise au point d’un procédé 1P1S¹².

1.5 Matériaux multi-catalytiques hybrides

Comme vu ci-dessus, les exemples, les concepts et les procédés qui peuvent être qualifiés de catalyse hybride sont nombreux. Cependant, il existe un concept de catalyseurs encore très peu étudié et qui présente de nombreux avantages : les matériaux multicatalytiques hybrides (MMCH). Une revue récemment publiée par Heuson *et al.*⁶² fait état de ces nouveaux catalyseurs présents dans la littérature. Les matériaux multicatalytiques hybrides (MMCH) se définissent par la co-immobilisation sur un même support de deux types de catalyseurs de nature fondamentalement différente. Il est donc question de la synthèse d’un nouveau type de catalyseurs. Potentiellement, il offre une synergie supérieure aux différents procédés vus jusqu’ici. Comparé à un procédé 1P1S, les centres actifs respectifs des deux catalyseurs sont présents sur le même support ce qui les contraint à être proches. Cette proximité permet potentiellement un effet synergique amélioré dû à la facilité de transfert des substrats. Différents termes sont employés dans la littérature pour définir ce genre de catalyseur, les MMCH¹² ou les « enzymes-metal hybrid catalysts ». ⁶³ Cette étude bibliographique les définira par le terme de MMCH. La Figure 9 représente schématiquement un MMCH et le procédé de transformation qu’il peut effectuer. Ce type de catalyseur sera un des objectifs de cette thèse.



Figure 9 : Représentation schématique d’un matériel multicatalytique hybride (MMCHs) issu de Heuson *et al.*¹²

La description de tels catalyseurs est relativement récente. Les exemples de publication faisant état de la synthèse de catalyseurs innovants débutent majoritairement à partir des années 2010. Par exemple, le travail de Filice *et al.* en 2013 décrit la synthèse de catalyseurs « enzyme métal nanobiohybrides »⁶⁴. Même si cet exemple ne correspond pas exactement à la définition d’un MMCHs, il fournit un excellent exemple de co-immobilisation de nanoparticules supportées (NPs) et d’une enzyme. Effectivement dans ce travail, en mixant une

solution enzymatique et une solution de nanoparticules (Pd, Ag ou Au) les auteurs ont synthétisé un nouveau catalyseur. Les NPs métalliques sont immobilisés directement sur la protéine (lipase). Cette dernière joue le rôle d’agent réducteur, de stabilisateur et de support pour les NPs tout en conservant son activité. L’enzyme et les nanoparticules ont pu conserver leur activité qui a mené à une double réaction séquentielle. De plus, en fonction des conditions sélectionnées, les auteurs étaient capables de favoriser l’activité de l’un ou l’autre catalyseur. Cependant l’absence de support a considérablement limité la recyclabilité du catalyseur.

À cause de leur robustesse et du panel de réactions qu’elles peuvent effectuer, les lipases sont présentes dans beaucoup d’exemples de catalyseurs hybrides⁶⁵⁻⁶⁷. Par exemple, Wang *et al.*⁶⁵ ont co-immobilisé des lipases sur un support de carbone-nitrile avec des nanoparticules de palladium pour des réactions de transestérification à partir d’un ester et d’un alcool. Zhang *et al.*⁶⁶, quant à eux, ont synthétisé un noyau catalytique polymérisé sur lequel les nanoparticules de palladium sont immobilisées. Ce dernier est revêtu avec du SiO₂ sur lequel la lipase CAL B est adsorbée. La séparation spatiale des catalyseurs leur permet de fonctionner sans aucune inhibition et dans un milieu réactionnel commun pour une réaction de résolution cinétique d’amines. Un an plus tard, Zhang *et al.*⁶⁷ ont décrit la synthèse de nanoparticules mésoporeuses comme support hétérogène pour des catalyses en tandem. De la même manière, l’immobilisation séparée des nanoparticules et de la lipase sur ce support leur a permis de fonctionner en tandem sans avoir à souffrir d’inactivation mutuelle. Un des paramètres clés de la synthèse de ce type de catalyseur était le contrôle de la dispersion des différents catalyseurs utilisés. Effectivement, une immobilisation trop proche des différents sites actifs peut mener à une inactivation mutuelle déjà observée dans les différents procédés 1P1S. La coopération et co-immobilisation entre les différents catalyseurs est donc un sujet primordial.^{63,68-76}

1.6 Conclusion intermédiaire

Les procédés 2P1S sont régulièrement confrontés à des limitations de diffusion de substrat à travers les membranes, ou encore, lors de l’utilisation d’un milieu biphasique, des problèmes de transports de substrat entre les différents milieux sont observés. *A contrario*, les procédés 1P2S permettent d’adapter indépendamment les étapes pour s’affranchir de ce genre de problème. Mais une adaptation du milieu réactionnel, en fonction de l’activité de l’un des catalyseurs, est nécessaire. Les procédés 1P1S ont prouvé leur efficacité pour la synthèse de composés à haute valeur ajoutée, cependant, leur mise en œuvre nécessite l’étude de tous les

paramètres qui peuvent influencer les deux types de catalyse. Le concept de catalyse hybride est particulièrement intéressant dans le contexte des bioraffineries, avec la biomasse comme une source de matière alternative aux processus usuels de fabrication pétrosourcés.⁷⁷ C’est pourquoi le domaine émergent de la catalyse hybride s’est également tourné vers la valorisation la biomasse lignocellulosique. Il s’agit de la ressource renouvelable la plus importante sur terre, elle est majoritairement composée de trois biopolymères : la cellulose, l’hémicellulose et la lignine, qui une fois dégradé peuvent mener à la production catalytique de nombreux composés d’origine biosourcée⁷⁸⁻⁸².

2 Accessibilité aux furfurylamines à partir du HMF

2.1 Réactions d’aminations réductrices sur le HMF

Le HMF (Figure 10) est majoritairement obtenu par la déshydratation des monosaccharides issus de la dépolymérisation de la biomasse (fructose, le glucose, le sucrose, la cellulose et l’inuline).⁷⁷ Comme décrit précédemment le HMF est l’une des molécules plateformes biosourcées les plus importantes avec un large panel de production déjà décrit. Sa première description remonte à 1895 où deux scientifiques (Dull et Kiermayer) ont découvert cette molécule indépendamment⁷⁷. Dull a reporté la découverte du HMF en faisant chauffer de l’insuline et de l’acide oxalique sous pression. Kiermayer a reporté un processus similaire, mais en utilisant de la canne à sucre comme substrat initial.

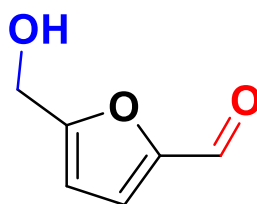


Figure 10 : Structure du HMF.

Le HMF est un composé qui possède un cycle furane, une fonction alcool et une fonction aldéhyde. En tant que molécule plateforme, il donne accès à différents produits aux applications variées selon les types de réactions¹. L’introduction de fonctions amines dans une molécule avec un cycle furane donne accès aux furfurylamines. Ainsi nous comparerons l’introduction de fonctions amines par voie chimique et biocatalytique afin de déterminer quel est le meilleur moyen d’introduire une fonction amine dans cette structure. Une fois le meilleur moyen sélectionné, nous comparerons également les voies chimiques et biocatalytiques d’oxydation afin de déterminer quel type de catalyse employer pour cette partie de la réaction.

2.1.1 Voie chimique

Les furfurylamines peuvent entrer dans la composition de nouveaux polymères d’origine biosourcée. Les monomères qui composent ces polymères sont donc issus de dérivés

furfuryliques biosourcés⁸. Les furfurylamines peuvent être obtenues par une voie d’amination réductrice chimique ou biocatalytique. Par voie chimique, les furfurylamines sont obtenues communément au travers d’une amination réductrice de la fonction carbonyle du groupement furfural en conditions douces avec des réactifs peu coûteux. Cependant, ces procédés requièrent souvent l’utilisation de groupements protecteurs, plusieurs étapes de synthèse et des produits réducteurs toxiques^{83,84}. Afin de remédier à ces inconvénients, plusieurs chemins catalytiques ont été développés ces dernières années⁸³⁻⁹⁰. Un des exemples les plus frappants est la méthode développée par Chatterje *et al* (entrée 1, Tableau 3). Ils ont développé un catalyseur (Rh/Al₂O₃) permettant l’amination réductrice directe de composés furaniques en furfurylamines dans des conditions réactionnelles douces (2 h à 80 °C dans une solution aqueuse d’ammoniaque à 28 % (mol)). Ils ont ainsi pu obtenir une conversion de 100 % avec une sélectivité de 91,5 % pour la furfurylamine. Cependant les conditions utilisées ne sont pas viables pour y ajouter un biocatalyseur dans l’optique du développement d’un procédé hybride. Le second exemple d’obtention d’amine primaire à partir du HMF s’est effectué au travers du travail de la synthèse du FDMA par Wang *et al.*⁸⁷ (entrée 4, Tableau 3). Dans cet exemple les auteurs ont achevé la synthèse du FDMA directement à partir du HMF. Le processus est récapitulé en Schéma 10.

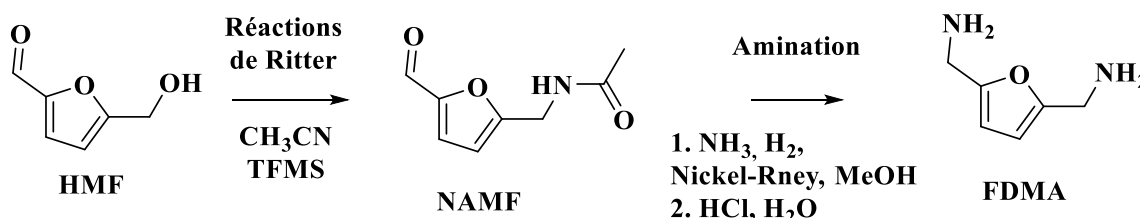


Schéma 10 : Réaction générale employée par Wang *et al.*⁸⁷ pour la synthèse du FDMA à partir du HMF.

Cependant ce travail inclut un travail en plusieurs étapes avec la synthèse préalable du composé NAMF avant hydrolyse acide de ce dernier dans un second temps pour l’obtention du FDMA. Chandra *et al.*⁸⁸ (entrée 5, Tableau 3) ont également réussi à synthétiser sélectivement le HMFA (95 %) et la furfurylamine (99 %) au travers de l’utilisation de nanoparticules de ruthénium supportées. Cependant le procédé inclut l’utilisation d’ammoniaque, d’une pression de dihydrogène et de MeOH comme solvant. Ces conditions sont beaucoup trop drastiques pour pouvoir espérer y introduire un biocatalyseur. Le travail de Ayedi *et al.*⁽⁹⁰⁾ (entrée 7, Tableau 3) a également permis de synthétiser la furfurylamine à partir du composé furfural (Schéma 11).

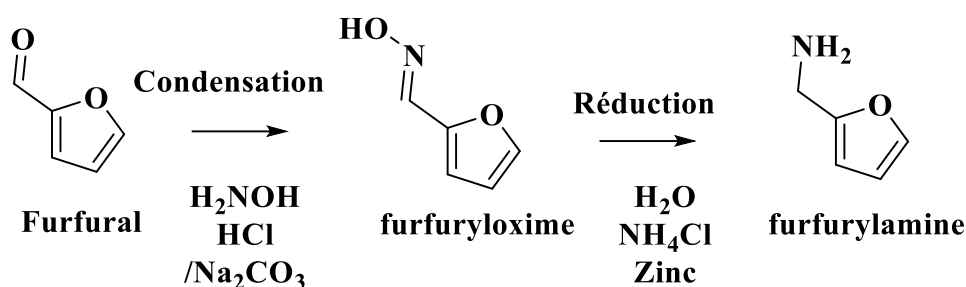


Schéma 11 : Réaction générale employée par Ayedi *et al.*⁹⁰ pour la synthèse de la furfurylamine à partir du furfural.

Après avoir étudié les deux réactions séparément (condensation du furfural avec de l’hydroxylamine pour donner le furfuryloxime puis réduction de ce dernier en furfurylamine), les auteurs ont réussi à mettre au point une réaction en un seul pot réactionnel avec un rendement de 98 % final en furfurylamine. Le procédé s’effectue en deux étapes avec d’abord la réaction d’amination (furfural/ $\text{NH}_2\text{NOH.HCl/Na}_2\text{CO}_3$ avec un ratio molaire de 1/1,2/0,6) puis l’ajout de zinc dans le même milieu réactionnel, le tout en 15 h de réaction.

Les voies d’amination réductrice chimique permettent donc bien d’obtenir le HMFA (et le FA) de manière sélective à partir du HMF (entrée 1,5 et 14, Tableau 3), mais dans des conditions qui ne sont pas susceptibles d’y accueillir un biocatalyseur, que ce soit dans un procédé hybride 1P1S ou 1P2S. En plus, ces synthèses peuvent présenter d’autres types d’inconvénients (sous-produits non valorisables) dus à la sensibilité du cycle furane aux conditions réductrices et la tendance de ces chemins à former des amines secondaires et/ou tertiaires⁹⁰⁻⁹³. En addition, ces synthèses sont déjà multi-étapes, et la présence de réactifs inhérents à ces étapes pourraient venir inhiber le biocatalyseur utilisé.

Les autres procédés présents dans la littérature font état de procédés d’amination réductrice, mais ces réactions incluent généralement une condensation entre une molécule possédant une fonction amine et le HMF ce qui mène à la formation d’amine secondaire (Tableau 3).

Tableau 3 : Synthèse des voies d'accès chimiques aux furfurylamines et leurs dérivés.

Entrée	Composé synthétisé	Catalyseur/ Conditions	Références	Sélectivité
1	Amine primaire	Rh@Al ₂ O ₃ 2 h, 80 °C, solution aqueuse d'ammoniaque	Chatterje <i>et al.</i> ⁸³	FA 91,5 % HMFA 86.3 %
2	Amine secondaire	FeNi, H ₂ , Réacteur en continu	Chieffi <i>et al.</i> ⁸⁴	-
3	Dérivés aminés du THF	Pd@Al ₂ O ₃ 120 °C, 20 h	Jiang <i>et al.</i> ⁸⁵	-
4	Amine primaire	Nickel raney NH ₃ , H ₂ , MeOH	Wang <i>et al.</i> ⁸⁷	FDMA 60 %
5	Amine primaire	Ru-NP NH ₃ , H ₂ , MeOH	Chandra <i>et al.</i> ⁸⁸	FA 99 % HMFA 95 %
6	Amine secondaire	Complexe de ruthénium	Xu <i>et al.</i> ⁸⁹	-
7	Amine primaire	Zinc metal	Ayedi <i>et al.</i> ⁹⁰	FA 98 %
8	Amine secondaire	Pd@C, H ₂ , H ₂ O	Rigo <i>et al.</i> ⁹⁴	-
9	Amine secondaire	Pd@MOFs, H ₂ , EtOH	Karve <i>et al.</i> ⁹⁵	-
10	Amine secondaire	Amination réductrice électrochimique	Roylance <i>et al.</i> ⁹⁶	-
11	Amine primaire	Ruthénium supporté NH ₃ , H ₂	Nishimura <i>et al.</i> ⁹⁷	FA 50-60 %
12	Amine primaire	Raney-Co NH ₃ , H ₂	Zhou <i>et al.</i> ⁹⁸	FA 98.9 %
13	Amine primaire	Ru@HZSM-5, NH ₃ , H ₂ , MeOH, 100 °C	Dong <i>et al.</i> ⁹⁹	FA 76 %
14	Amine primaire	Ni@SBA-15, NH ₃ , H ₂ , 100 °C, 4h, MeOH, H ₂ O	Chen <i>et al.</i> ¹⁰⁰	HMFA 89.8 %
15	Amine secondaire	Catalyseurs au Pd, NH ₃ , H ₂ , N ₂ , MeOH	García-Ortiz <i>et al.</i> ¹⁰¹	-
17	Amine secondaire	Catalyseurs à l'or	Zhu <i>et al.</i> ¹⁰²	-

***FA** : furfurylamines, **HMFA** : 5-hydroxyaminomethylfurfural, **FDMA** : 2,5-diaminofurfural

2.1.2 Voie biocatalytique

Les enzymes sont utilisées dans un grand nombre de secteurs industriels, tels que l’alimentation, les textiles, les produits pharmaceutiques, les détergents, etc.^{103,104} Parmi la grande diversité d’enzymes disponibles dans la nature, les enzymes dépendantes du pyridoxal 5'-phosphate (PLP) représentent 4 % des enzymes classées par la commission des enzymes.¹⁰⁵ Dans le cadre de mon projet de thèse, nous avons choisi de nous tourner vers cette alternative efficace et simple pour effectuer l’amination réductrice des dérivés furaniques. L’un des avantages conséquents de ces enzymes est leur capacité à convertir efficacement les groupements carbonyles en amines primaires en milieu aqueux et à température ambiante.^{91,92} Les transaminases (TA) font partie de cette catégorie et permettent de transférer un groupe amino d’un donneur sur le groupe carbonyle d’un accepteur. Afin de réaliser ce transfert, les TA nécessitent que le PLP soit lié au site actif par une liaison de type base de Schiff avec le groupe ϵ -amino d’une lysine du site actif¹⁰⁶. Le mécanisme des TA est basé sur la formation de l’intermédiaire imine entre le substrat et le PLP dans le site actif de l’enzyme. Le mécanisme est présenté en Figure 11⁹.

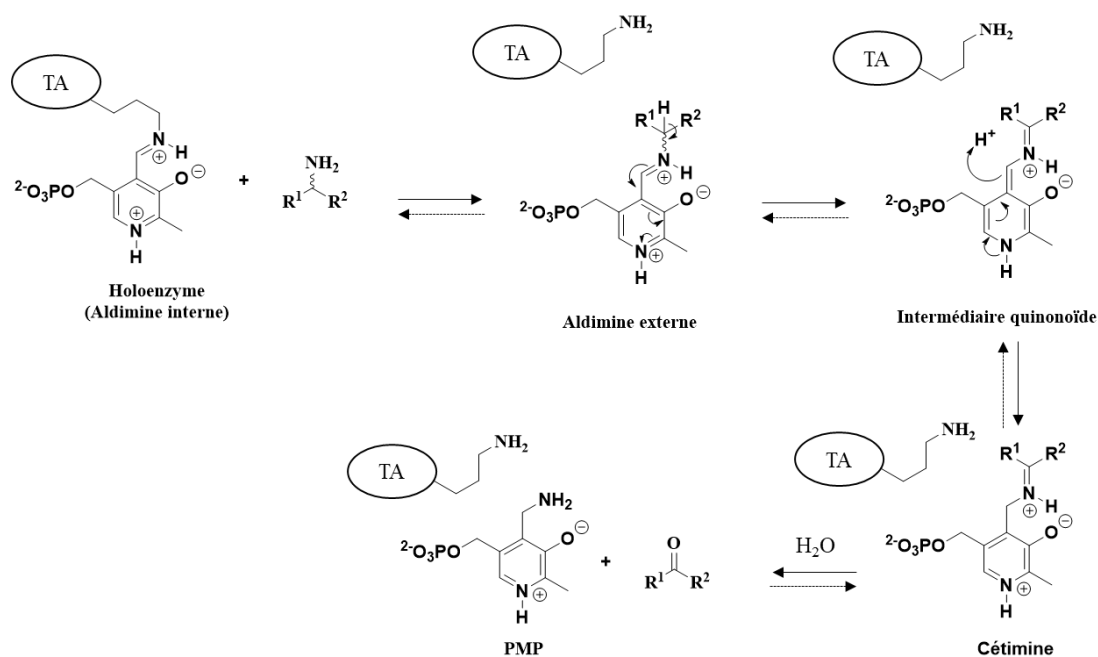


Figure 11 : Mécanisme de transamination issu de Heuson et al.⁹

Une réaction de transamination correspond à l’enchaînement de 2 demi-réactions. La première (flèches pleines, Figure 11) permet de former le co-produit carbonylé. Le PMP formé est ensuite lié au substrat accepteur et la seconde demi-réaction entre en œuvre (flèches en

pointillé, Figure 11). Cette dernière correspond au processus inverse de la première demi-réaction et permet de transférer le groupement amino présent sur le coenzyme sur le substrat accepteur.

La première mention d’une transaminase remonte à 1930 avec les travaux de *Needham*¹⁰⁷ qui a mis en relation la quantité de glutamine, d’aspartate et d’oxaloacétate dans le muscle du pigeon. Depuis cette découverte, de nombreuses TA ont été utilisés en synthèse, notamment pour l’obtention d’amines chirales.^{108,109} En effet, la synthèse d’amines optiquement pures est un défi important, car ce sont des produits de grande valeur ou des intermédiaires clés pour un grand nombre de composés bioactifs.¹⁰⁹ Par rapport à d’autres procédés tels que la catalyse hétérogène ou la chimie organique, les réactions enzymatiques possèdent des avantages non négligeables comme une sélectivité élevée.¹¹⁰ De plus, elles fonctionnent dans des conditions réactionnelles douces et sont biodégradables.¹¹¹ Récemment, plusieurs ω -transaminases ont été décrites pour la synthèse de furfurylamines à partir de dérivés furaniques.⁹² *Dunbabin et al.* ont notamment achevé la synthèse de 5-hydroxymethylfurfurylamine (HMFA), 2,5-diméthylaminefurane (FDMA), et acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) (représenté en Figure 12).

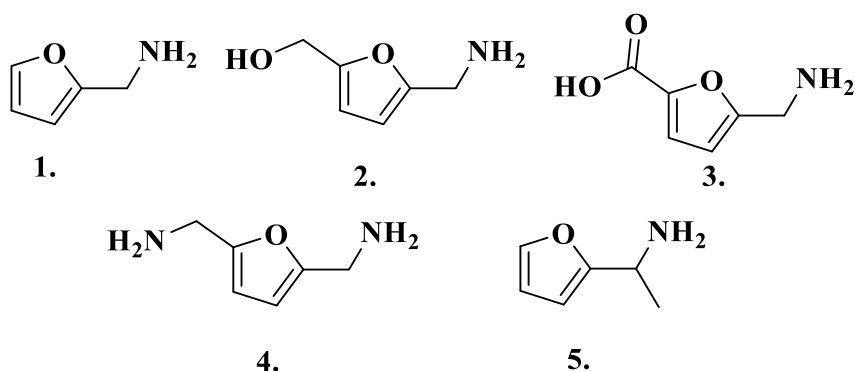


Figure 12 : Structure des différents produits aminés obtenus après amination réductrice par voie biocatalytique par *Dunbabin et al.*⁹² **1.** Furfuryl amine (FA) **2.** 5-hydroxyméthylfurfurylamine (HMFA) **3.** Acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) **4.** 2,5-diméthylaminefurane (FDMA) **5.** 1-méthylfurfurylamine (MFA).

Ainsi l’obtention de furfurylamines par voie biocatalytique s’effectue dans des conditions beaucoup plus douces (température ambiante, milieux aqueux tamponnés) que celles par voie

chimique (température >60 °C, pression d’hydrogène, solvant organique). De plus les transaminases présentent une sélectivité beaucoup plus élevée envers le produit aminé sans former des amines secondaires/tertiaires, le tout en une seule étape. Ainsi nous validons ici l’idée définie dans le préambule, il est choisi d’utiliser des transaminases afin d’effectuer une réaction de transfert d’amine sur le HMF qui pourront nous mener directement au HMFA.

L’idée est de combiner une transaminase et un catalyseur d’oxydation pour aller vers la production de furfurylamines. L’objectif final était de mettre en œuvre une réaction hybride « one-pot/one-step », c’est-à-dire où les deux catalyseurs sont présents au début de la réaction dans le même pot réactionnel. La difficulté majeure était donc de trouver des conditions qui conviennent parfaitement aux deux catalyseurs afin d’arriver à une conversion maximale de HMF. D’autre part, la combinaison d’une transaminase et d’un catalyseur d’oxydation dans le même pot réactionnel pourra mener à différentes structures de furfurylamines en fonction de la sélectivité du catalyseur hétérogène utilisé. Comme très peu d’études décrivent la conversion du HMF et ses dérivés en équivalents animés, la première partie de notre travail se focalisera donc sur la sélection et caractérisation d’une transaminase capable d’effectuer ces réactions.

A contrario, l’oxydation du HMF par des catalyseurs hétérogènes métalliques est une réaction très étudiée. Cette réaction peut mener à deux produits majoritaires qui possèdent des fonctions aldéhydes et donc susceptibles d’être convertis en furfurylamines par une transaminase. Il s’agit du 2,5-dicarboxaldéhydefurane (DCAF) et de l’acide 5-aldéhyde-2-furancarboxylique (AFCA). Comme il sera indiqué plus tard le FDMA (obtenu à partir du DCAF) ne sera pas un synthon visé au cours de ces travaux de thèse. De ce fait, la molécule cible de la partie oxydation du procédé sera le composé AFCA. La partie suivante se penchera donc sur la synthèse sélective de ce composé à la fois de manière chimique et biologique.

2.2 Synthèse spécifique des composés d’oxydations

2.2.1 Synthèse spécifique du composé AFCA

2.2.1.1 Synthèse de l’AFCA par catalyse hétérogène

La synthèse spécifique du composé AFCA à partir du HMF par catalyse hétérogène est beaucoup moins décrite dans la littérature. Un seul exemple a été trouvé datant de 1990.¹¹² Dans ce travail Vinke *et al.* ont étudié l’oxydation du HMF par un catalyseur de platine supporté sur alumine et en milieu liquide. La conversion et la sélectivité du catalyseur ont été étudiées

grâce à plusieurs paramètres, tels que la température, le pH, la concentration initiale en substrat et la concentration en oxygène. Les auteurs ont conclu que l’oxydation du HMF par un catalyseur au platine passe en majorité par un intermédiaire AFCA. Le fait d’employer une voie oxydative menant sélectivement à la molécule AFCA serait idéal dans le cadre d’une réaction hybride. Effectivement une fois sa structure confirmée, une réaction d’animation réductrice sur l’aldéhyde restant mènerait directement à l’AMFC.

2.2.1.2 Synthèse de l’AFCA par biocatalyse

Similairement à la catalyse hétérogène, les exemples de synthèse par biocatalyse sélective du composé AFCA ne sont pas légion dans la littérature ¹¹³⁻¹¹⁵. *Qin et al* ¹¹³ se sont employés à définir et tester une multitude de systèmes pour la synthèse spécifique des différents produits d’oxydation du HMF. La synthèse de l’AFCA était effectuée par un système laccase-TEMPO. Ce dernier a joué le rôle de médiateur et a notamment permis l’oxydation de la fonction alcool restante sur le composé intermédiaire HFCA. L’oxydation de la fonction alcool est généralement une étape limitante dans la plupart des réactions d’oxydation. *In fine*, trois laccases différentes ont été testées avec ce système pour obtenir des rendements finaux allant de 68 à 82 % en AFCA. L’emploi d’une aryl-alcool oxydase (AAO) par *Carro et al* ¹¹⁴ leur a permis d’effectuer une conversion presque complète en AFCA du HMF. Étonnamment, dans leur cas, la seconde fonction aldéhyde n’est pas immédiatement consommée pour être transformée en acide et donner le FDCA. Les auteurs ont dû mettre au point une cascade catalytique qui inclue une UPO pour finaliser la conversion. Ce manque de réactivité est potentiellement dû au fait que l’AAO n’accepte pas l’AFCA comme substrat.

Une nouvelle laccase découverte par *Zhang et al.* ¹¹⁶ a permis une conversion du HMF (23,5 %), mais avec une sélectivité de 82,5 % pour l’AFCA. Après optimisation des conditions réactionnelles et en utilisant le médiateur TEMPO, les auteurs ont réussi à convertir la totalité du HMF présent dans le milieu réactionnel avec une sélectivité >80 % pour le composé AFCA. Cependant ils ont dû utiliser une quantité importante d’enzyme libre (50 U). Contrairement à la voie de synthèse par catalyse hétérogène, les voies biocatalytiques proposent des synthèses spécifiques de ce composé. Mais la synthèse spécifique par voie biocatalytique du composé AFCA nécessite l’utilisation d’enzyme spécifique et/ou une cascade catalytique couplée avec un médiateur ce qui implique des conditions de mise en œuvre relativement compliquées. De plus l’emploi de cascades catalytiques implique l’emploi de nombreuses molécules (cofacteur enzymatique, réactions spécifiques de conditions) qui pourraient potentiellement venir inhiber

le catalyseur hétérogène d’oxydation. Afin d’avoir une vision plus complète de la capacité des catalyseurs à convertir le HMF en AFCA, les différentes voies de transformation pour l’obtention du FDCA sont étudiées. Effectivement, nous supposons ici qu’en contrôlant la cinétique d’oxydation, grâce à l’utilisation d’un catalyseur apte à convertir le HMF en FDCA et/ou le mécanisme passe par la formation du composé AFCA, une transamination serait effectuée pour la production directe de l’AMFC.

2.2.2 Synthèse spécifique du FDCA

2.2.2.1 Synthèse du FDCA par catalyse hétérogène

Une de ses premières oxydations catalytiques remonte à 1993 avec le travail de Verdeguer ¹¹⁷ ou la mécanistique d’oxydation a été étudiée avec un catalyseur au platine. Ce point a déjà été discuté, et le passage par l’intermédiaire AFCA a été constaté. Le FDCA, comme son homologue, l’acide téréphtalique, se caractérise par ses deux fonctions acides carboxyliques pouvant mener à une large panoplie de polymères. Comme évoqué principalement, l’obtention du PEF à grande échelle pourrait remplacer le PET (pétrosourcé). De nombreux procédés catalytiques sont disponibles pour l’obtention du FDCA, cependant un des plus exploités est la transformation du HMF grâce à une catalyse avec des nanoparticules d’or supportées ¹¹⁸⁻¹²¹. L’utilisation de nanoparticules supportées permet de parer à l’utilisation de métal oxydant (comme le manganèse et le chrome) qui est généralement utilisé en conditions stœchiométriques. De plus ces derniers sont relativement toxiques et ne peuvent pas être recyclés. Le Tableau 4 donne un aperçu des différents types de catalyseurs utilisés pour la conversion du HMF en FDCA en milieux aqueux.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des catalyseurs hétérogène d’oxydations chimiques utilisé pour la conversion du HMF en FDCA.

Entrée	Métal	Références
1	Pt	122-128
2	Pd	129-132
3	Au	118-121
4	Au-Cu	133,134
5	Au-Pd	135-137
6	Ru	138-140
7	Autres	141-150

Les supports les plus communs pour l’oxydation du HMF en FDCA sont le CeO_2 et le TiO_2 . Bien que ces catalyseurs permettent une conversion efficace dans des milieux aqueux, l’ajout d’une base est souvent nécessaire pour augmenter le rendement réactionnel en FDCA. Or l’ajout d’une base dans le milieu contenant le biocatalyseur pourrait amener à une dégradation de ce dernier. Lors de l’oxydation du HMF en FDCA par des catalyseurs supportés à l’or, l’étape limitante est généralement la conversion du HFCA en AFCA (conversion de la fonction alcool en aldéhyde, Figure 13).

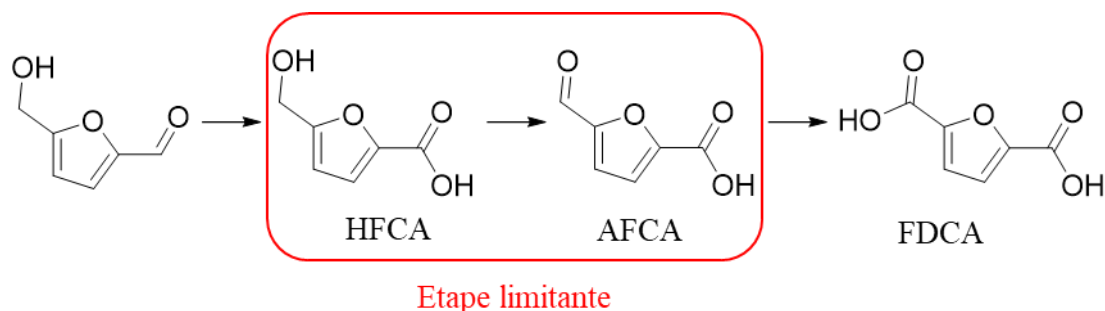


Figure 13 : Représentation de l’étape limitante lors de l’oxydation du HMF par des nanoparticules d’or supportées.

Pour parer à ce problème, une des solutions est d’employer des catalyseurs bimétalliques. Par exemple, des catalyseurs Au-Cu supportés sur TiO_2 permettent d’augmenter l’activité catalytique et d’augmenter la conversion du HFCA vers le FDCA^{133,134}. La synergie observée entre les particules de cuivre et les particules d’or a permis de conserver une activité catalytique plus importante que pour le catalyseur à l’or seule. Cela peut être dû à l’effet stabilisant des particules de cuivre sur le support du catalyseur. En conclusion, dans l’optique de la mise en œuvre d’un procédé hybride qui passerait par la formation spécifique d’AFCA, l’emploi de nanoparticules d’or semble contre-indiqué. Le fait que la formation du composé AFCA soit limitante laisse supposer que ce dernier sera immédiatement consommé une fois formé pour mener au FDCA. Ainsi la transaminase n’aura pas le temps d’agir pour convertir la fonction aldéhyde en amine. Cette activation est apparemment faisable grâce à l’utilisation du palladium et/ou du platine¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Ainsi, plusieurs catalyseurs bimétalliques Au-Pd ont été synthétisés¹³⁵⁻¹³⁷. L’idée est de pouvoir combiner deux types de métaux aux propriétés catalytiques différentes pour obtenir une synergie et ainsi un catalyseur plus efficace et actif. La présence mutuelle d’Au et de Pd permet des réactions concomitantes d’oxydations des fonctions alcool et aldéhyde présentes sur le HMF. En conclusion l’utilisation d’un catalyseur

bimétallique Au-Pd dans des conditions réactionnelles douces permettrait peut-être la formation majoritaire d’AFCA sans formation prédominante de FDCA. Cela pourrait mener à un rendement quantitatif d’AFCA.

L’utilisation de catalyseurs au platine semble plus indiquée pour la formation du composé AFCA. Si ce dernier est un intermédiaire conséquent de la formation du FDCA, en modulant les conditions réactionnelles, nous pourrions réussir à limiter la conversion en FDCA et ainsi, laisser le temps à la transaminase d’agir pour convertir la fonction aldéhyde en amine. Bien d’autres exemples de catalyse hétérogène qui utilisent toute une variété de supports et de métaux existent dans la littérature¹⁴¹⁻¹⁵⁰. Nous pouvons donc supposer que le platine est un bon compromis pour notre système hybride si la cinétique d’oxydation est minutieusement contrôlée pour arrêter la réaction à l’intermédiaire AFCA. Si la catalyse hétérogène chimique offre un grand choix de catalyseurs et une sélectivité élevée en fonction du produit d’oxydation désiré, cela implique l’utilisation de bases et de solvants qui ne sont potentiellement pas acceptables pour l’enzyme. Afin d’être parées à toutes les issues et de pouvoir effectuer une comparaison, les voies d’oxydation biocatalytique du FDCA sont également étudiées dans la littérature.

2.2.2.2 Synthèse du FDCA par biocatalyse

La production et synthèse biocatalytique du FDCA peut s’effectuer de nombreuses manières (Figure 14). Au sein des voies biocatalytiques, on peut séparer deux grandes catégories : la production directe du FDCA grâce à des cellules entières ou l’amélioration d’une voie métabolique du microorganisme pour la production directe de ce composé. L’autre option est la synthèse directe en utilisant des enzymes. La production du FDCA est très bien documentée dans la littérature¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Cette partie ne se voudra donc pas exhaustive du mode de production biocatalytique du FDCA, mais essaiera de mettre en évidence les avantages et inconvénients comparés à la production par catalyse hétérogène. Un des premiers exemples de synthèse de ce composé remonte à 1996 où Van Deurzen *et al.*¹⁵⁸ ont utilisé une chloroperoxydase (CPO) pour l’oxydation sélective du HMF en FDCA avec 74 % de rendement et un seul sous-produit majoritaire (HFCA). L’oxydation sélective en FDCA par des enzymes peut nécessiter une cascade catalytique afin de pousser la conversion jusqu’à l’acide carboxylique^{113,115,159,160}. Le fait d’utiliser une cascade catalytique est commun, car la conversion du HMF en FDCA implique une série de trois réactions d’oxydation consécutive. Une seule enzyme est rarement capable de prendre en compte autant de réactions.

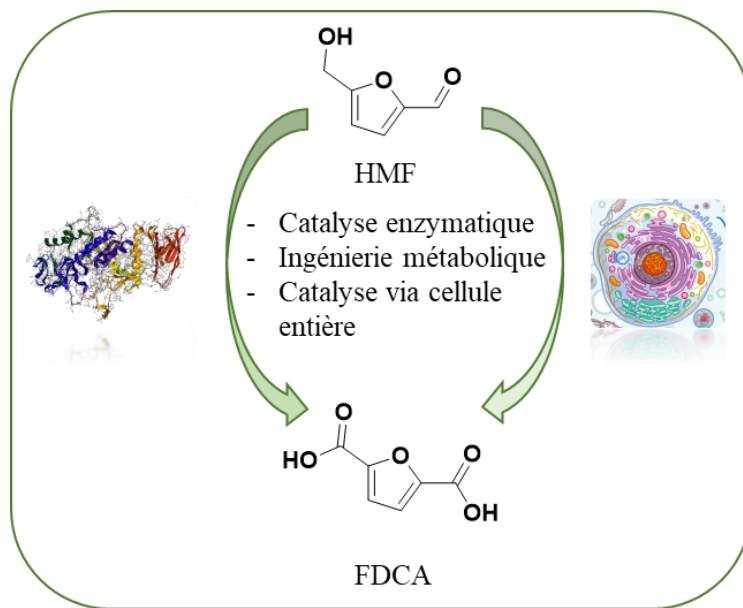


Figure 14 : récapitulative des différentes voies biocatalytiques pour la production du FDCA.

Par exemple, Qin *et al.*¹¹³ ont dû coupler l’action d’une galactose oxydase pour obtenir le DCAF, puis de pousser l’oxydation grâce à un système laccase/H₂O₂ pour convertir les fonctions aldéhydes en acides carboxyliques. Karich *et al.*¹⁶⁰, quant à eux ont réussi à prouver la compatibilité entre des enzymes peroxygénases non spécifiques (UPO) et des oxydases fongiques pour convertir le HMF en FDCA. Mais comme mentionnée précédemment, afin d’obtenir des rendements conséquents, les auteurs ont dû avoir recours à des quantités conséquentes d’enzymes (environ 50 U pour 1 mg de produit), ce qui est loin d’être réaliste pour un passage à l’échelle industrielle. Une cascade catalytique encore plus évoluée a été mise au point par Jia *et al.*¹¹⁵ Ils ont tiré profit de la dualité de deux enzymes avec un système interne de recyclage d’H₂O₂ pour la production de FDCA.

Comme le HMF est un produit naturellement présent dans les voies métaboliques et qu’à une trop haute concentration il est potentiellement létal, des enzymes spécifiques doivent être capables de le dégrader. Le travail de Djikman *et al.*¹⁶¹ a permis de découvrir une 5-hydroxymethylfurfural oxydase. En identifiant les gènes responsables de sa production, les auteurs ont pu produire l’enzyme spécifique dans une souche d’*E. coli*. De nombreux autres exemples d’oxydation du HMF en FDCA par catalyse enzymatique existent^{162–169}. Les voies catalytiques pour la production de FDCA grâce à l’ingénierie métabolique de microorganismes sont présentes dans la littérature^{170–176}. Cette partie ne sera pas traitée, car elle concerne moins

le sujet de catalyse hybride. Une combinaison entre des nanoparticules métalliques et ce genre de catalyseurs impliquerait une adsorption des nanoparticules directement à l’intérieur de la cellule. Cela est hors de notre champ d’expertise. En revanche, une biocatalyse par des cellules entières reste une option envisageable. Effectivement, similairement aux procédés hybrides, des cellules entières possédant des enzymes oxydantes spécifiques sont une piste à envisager, dans la mesure où cela serait un gain de temps, d’argent et d’énergie. Par exemple le travail de Qhang *et al*¹⁷⁷ les auteurs ont réussi à synthétiser sélectivement le HFCA sans inhibition de la cellule. D’autres exemples de synthèse du HFCA par des cellules entières existent^{178,179}.

3 Immobilisation enzymatique : introduction du concept

Afin d’améliorer l’efficacité des TA et d’utiliser cette enzyme dans une application industrielle, l’étape logique suivante consiste à immobiliser les TA sur un support solide. Cela afin d’assurer leur stabilité dans des conditions de réaction difficiles, leurs récupérations et par conséquent, leurs réutilisations.

L’immobilisation enzymatique permet une recyclabilité et un turn-over plus important¹⁸⁰. Elle peut être classée en quatre catégories principales : 1) la liaison covalente ; 2) l’adsorption ; 3) l’immobilisation par affinité ; et 4) le piégeage. La littérature décrit une grande variété de matériaux qui peuvent être utilisés comme supports pour l’immobilisation des enzymes en fonction de l’application souhaitée. Plusieurs avantages sont liés à l’immobilisation d’enzymes, notamment le fait que l’enzyme immobilisée peut être facilement retirée du mélange réactionnel et peut fournir une protection contre les conditions difficiles (température, agents oxydants ou surfactants).¹⁰³ Différentes méthodes d’immobilisation ont été décrites pour l’immobilisation des TA¹⁸¹. Comme la méthode d’immobilisation utilisée au cours de ma thèse fût une méthode d’adsorption, cette partie de l’état de l’art sera majoritairement focalisée sur la méthode par adsorption.

L’une des premières occurrences de TA immobilisés a été rapportée par Ikeda *et al*.¹⁸² en 1974, où ils ont immobilisé de manière covalente une aspartate aminotransférase sur une Sepharose B activé par CNBr. Ce dernier est un polymère constitué de chaînes d’agarose. Ils ont testé la conversion stœchiométrique du L-aspartate en oxaloacétate avec un excès de 2-oxoglutarate¹⁸². Ils ont rapporté une immobilisation de 60 % avec une activité conservée de 20 % par rapport à l’enzyme libre. Les auteurs ont démontré l’utilité de leur système immobilisé en montrant que l’enzyme immobilisée conservait son activité après 24 heures à 37 °C. La

raison de cette étude est de déterminer quel type d’immobilisation de la transaminase pourrait conduire à une amélioration des paramètres généraux (gamme de pH, température, co-solvant, recyclabilité, stockage). Cela afin de déterminer la meilleure option pour les inclure dans une réaction one-pot en combinaison avec des nanoparticules supportées. Cependant, certains facteurs physico-chimiques peuvent influencer les performances de l’enzyme immobilisée^{180,183}.

L’immobilisation par adsorption repose sur l’interaction physique entre le support et l’enzyme, et comprend des modes de liaison tels que les forces de Van der Waals, les interactions ioniques et la liaison hydrogène¹¹⁰. Bien sûr, ces liaisons ne sont pas aussi fortes que les liaisons covalentes, mais elles présentent plusieurs avantages, tels que la non-modification de la structure native de l’enzyme, la protection du site actif tout en conservant son activité. Tout comme l’immobilisation covalente, des supports organiques et inorganiques sont disponibles pour une immobilisation par adsorption des TA.

Afin d’obtenir une immobilisation plus rapide et plus simple des enzymes, l’un des développements les plus prometteurs est l’insertion d’une séquence 6x-His-tag dans le gène codant. En effet, cette insertion va permettre l’immobilisation par adsorption sur plusieurs ions métalliques tels que Ni⁺, Cu²⁺, Co²⁺ ou Fe^{2+/3+} grâce à de faibles interactions entre l’histidine et les ions métalliques. Dold *et al.* ont utilisé cette technique afin d’immobiliser une transaminase de *Variovorax paradoxus* sur des microbilles magnétiques polyvinyliques non poreuses fonctionnalisées avec de l’acide iminodiacétique (IDA)¹⁸⁴. L’IDA joue le rôle de ligands qui forment un complexe chélaté avec l’ion métallique et seront capables de lier l’enzyme étiquetée His. Les trois ions métalliques possèdent des caractéristiques et des propriétés différentes : Cu²⁺ est reconnu pour avoir une forte capacité de liaison, mais une faible spécificité, Co²⁺ a une bonne spécificité, mais une mauvaise efficacité de liaison. Le Ni²⁺ semble être un bon compromis avec une efficacité de liaison et une spécificité par les enzymes relativement bonnes. Connaissant ces paramètres, les auteurs ont obtenu la meilleure activité lors de la liaison avec Ni²⁺ avec une activité relative de 100 % par rapport aux enzymes libres contre 85 % pour Co²⁺ et 21 % pour Cu²⁺. Les auteurs ont supposé la formation d’un complexe Cu²⁺-PLP qui peut expliquer la faible activité relative dans ce cas. De plus, une activité relative de 17 % a été observée à 60 °C alors que l’enzyme libre n’a montré aucune activité. De plus, la TA immobilisée a montré une forte activité à pH 11 et après 38 jours de stockage à 4 °C.

Cassimje *et al.* ont utilisé le même concept pour produire un nouveau support porteur basé sur des verres à porosité contrôlée (CPG). Ils ont enduit le CPG de divers polymères

(hydrophiles, hydrophobes, semi-hydrophobes) et ajouté des ligands afin d’y fixer des ions métalliques ¹⁸⁵. En immergeant directement le lysat cellulaire avec le nouveau support, ils peuvent immobiliser complètement l’enzyme en 20 minutes avec une agitation orbitale. En utilisant le support revêtu de chlorure de vinylbenzyle (PVC), les auteurs ont mesuré avec succès l’activité dans un modèle de réaction de transamination (amination du 1-phénoxypropane en utilisant la 1-phényléthyl-amine comme donneur) où le lysat n’a exprimé aucune activité catalytique. Ceci est probablement dû au caractère hydrophobe du support qui a empêché la dénaturation de l’enzyme dans de telles conditions. La stratégie globale est présentée dans la Figure 15. Cette méthode d’immobilisation nous permettrait donc d’immobiliser spécifiquement les transaminases taguées sans passer par une étape préalable de purification.

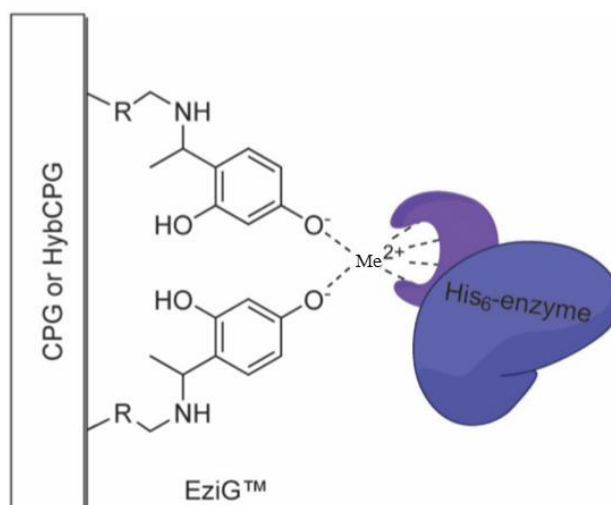


Figure 15 : stratégie globale d’immobilisation par adsorption issu de Cassimje *et al.* ¹⁸⁵

Malgré les interactions plus faibles que la formation d’un lien covalent pour l’immobilisation des TA, la technique d’adsorption semble être un bon compromis afin d’obtenir un catalyseur efficace et réutilisable. En plus de propriétés similaires à l’attachement covalent, l’immobilisation sur certains supports permet une transamination directement dans un solvant organique. Nous avons donc opté pour une immobilisation sur un support EziG™. Cette méthode d’immobilisation par adsorption nous apportera plusieurs avantages. Le premier est

l’immobilisation spécifique des protéines taguées. Effectivement, comme l’immobilisation a lieu par interaction avec le tag-histidine, nous pouvons espérer une immobilisation directement à partir du lysat cellulaire en nous affranchissant de l’étape de purification. De plus cette méthode d’immobilisation ne requiert aucun emploi de produits potentiellement toxiques ni d’étape de préparation du support, telle que l’ajout d’un linker. C’est donc un gain en termes de produits utilisés, de temps et d’énergie.

4 Conclusion

En conclusion, l’étude des différents procédés hybrides nous a permis de mettre en lumière les avantages et inconvénients de chaque procédé. Les procédés 2P1S, malgré une modulation indépendante des milieux réactionnels propres à chaque catalyseur, peuvent se voir confrontés à des limitations de diffusion de substrat à travers les membranes. Ou encore, lors de l’utilisation d’un milieu biphasique, des problèmes de transports de substrat entre les différents milieux. *A contrario*, les procédés 1P2S permettent d’adapter indépendamment les étapes pour s’affranchir de ce genre de problème. Mais une adaptation du milieu réactionnel en fonction de l’activité de l’un des catalyseurs est nécessaire et peut mener à une baisse significative du rendement final. Les procédés 1P1S ont prouvé leur efficacité pour la synthèse de composés à haute valeur ajoutée, cependant, la mise en œuvre de ce type de procédés nécessite l’étude de tous les paramètres pouvant influencer les deux types de catalyse mis en œuvre. Le fait de pouvoir combiner deux catalyseurs dans un seul et même milieu réactionnel implique une coopération totale entre les deux catalyseurs. Cette compatibilité peut mener à une synergie due à la proximité des sites actifs.

L’obtention de synthons aminés (AMFC), grâce à la mise en œuvre d’un procédé hybride 1P2S, à partir du HMF nécessite une oxydation préalable. Pour la synthèse de ce composé il est nécessaire de contrôler minutieusement la cinétique d’oxydation du HMF afin de ne pas former l’acide 5-hydroxyméthyl-2-furancarboxylique (HFCA), et l’acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA) et obtenir uniquement le 5-aldéhyde-2-furancarboxylique (AFCA). Cela va permettre à la transaminase d’agir sur la fonction aldéhyde pour obtenir l’AMFC. Ou, *à contrario*, si la transaminase agit plus vite, et transforme le HMF en HMFA, il sera nécessaire de sélectionner un catalyseur capable d’oxyder sélectivement le HMFA en AMFC.

L’introduction de la thèse permettra donc de mener la réflexion effectuée afin de déterminer quel chemin réactionnel emprunter pour synthétiser des furfurylamines directement à partir du HMF, ainsi que le type de procédé que nous allons mettre en œuvre.

Introduction : Développement d'un procédé hybride pour la synthèse directe de furfurylamines à partir du HMF : réflexion et stratégie

Comme décrit dans le préambule, une combinaison entre une enzyme de la classe des transférases, une transaminase, et des nanoparticules métalliques supportées (NPs), a été sélectionnée pour réaliser le développement d'un procédé hybride pour la synthèse directe de furfurylamines à partir du HMF. Il nous a permis d'identifier deux synthons susceptibles de nous intéresser, le FDMA et l'AMFC. Nous avons choisi de focaliser le travail sur la production de l'AMFC. La structure unique de ce dernier, une fonction amine et une fonction acide carboxylique reliées par un cycle furane, font de lui acide aminé non-naturel valorisable sous de nombreuses formes. En effet, à partir de ce synthon, une polymérisation peut être envisagée pour la formation de polyamides, ou une réaction d'amidation ou d'estérification pour la synthèse de nouveaux tensioactifs d'origine biosourcée. Les différents chemins potentiels menant à l'AMFC qui combinent une oxydation et un transfert d'amine sont décrits en Figure 16.

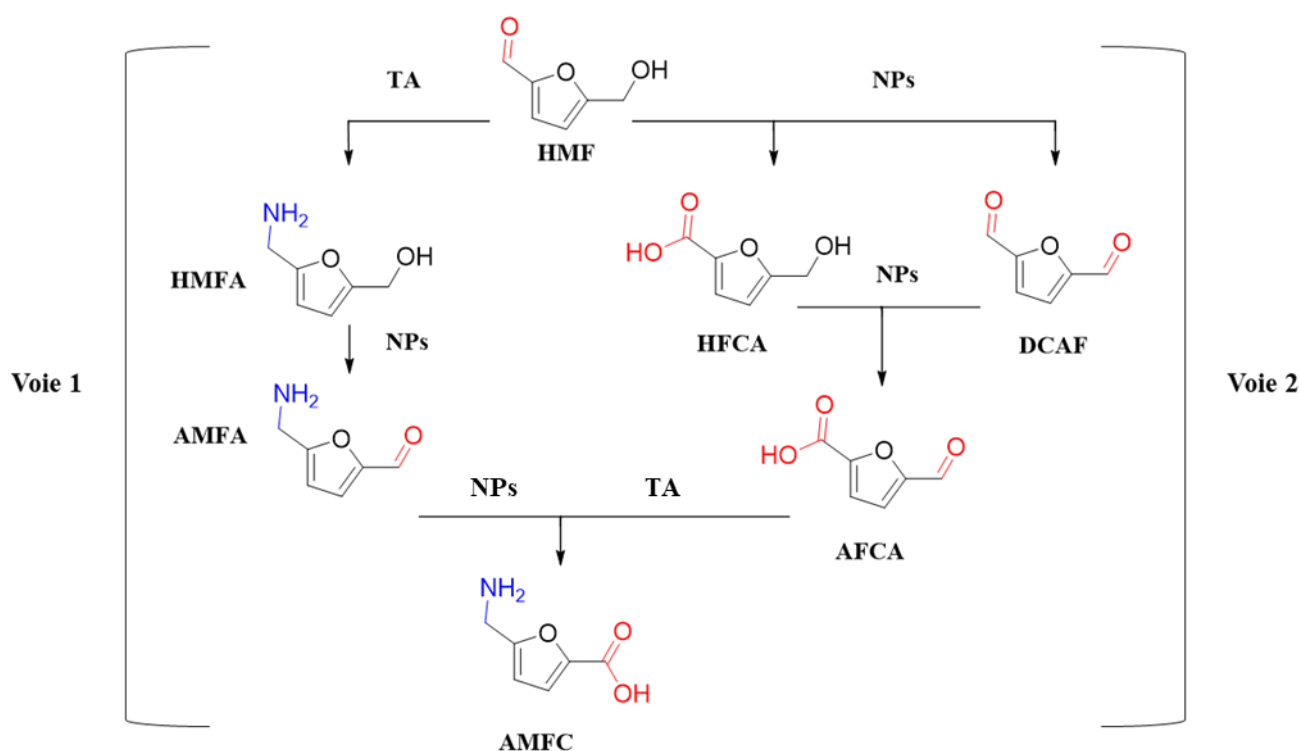


Figure 16 : Composés chimiques obtenus à partir de l'oxydation (NPs : nanoparticules métalliques supportées) des groupes hydroxyle et carbonyle de l'acide 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) : 2,5-dicarboxaldéhydefurane (DCAF), acide 5-hydroxyméthyl-2-furancarboxylique (HFCA), 5-aldéhyde-2-furancarboxylique (AFCA) et acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA) et de l'amination réductrice (TA : transaminase) des dérivés carbonylés correspondants 5-hydroxyméthylfurfurylamine (HMFA), 5-aminométhyle-2-furancarboxaldéhyde (AMFA), l'acide 5-aminométhyle-2-furancarboxylique (AMFC).

La synthèse spécifique de l'AMFC peut s'imaginer de deux manières. Premièrement, si la transaminase (TA) est utilisée en premier, la conversion du HMF mènera au HMFA (Figure 16, voie 1). Cette voie paraît envisageable, car Dunbabin *et al.* ont démontré l'efficacité des TA à transformer le HMF en HMFA avec d'excellents rendements (respectivement 75 % et 89 % avec la MBA et l'IPA comme donneur d'amine)¹⁸⁶. Dans ce cas-là, il faudra sélectionner un catalyseur d'oxydation actif sur le HMFA.

La deuxième voie passe par une oxydation spécifique du HMF en AFCA (voie 2, Figure 16). Une fois celle-ci réalisée, la transaminase peut alors être ajoutée au milieu réactionnel pour convertir ce composé en AMFC. Cependant, comme il est décrit dans la littérature, la production d'AFCA n'est pas chose aisée et la majorité des publications s'emploie à décrire la synthèse directe du FDCA. Cela pourrait engendrer un rendement inférieur en AMFC dû à la présence de produit(s) d'oxydation non transformable(s) en équivalents aminés, tels que l'HFCA ou le FDCA. Le Tableau 5 résume les différents défis à surmonter pour la mise en œuvre de ces deux chemins réactionnels.

Tableau 5 : Défis identifiés pour la synthèse directe de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique à partir du HMF grâce à la mise place d'un procédé hybride 1P2S.

	Défis voie réactionnelle 1	Défis voie réactionnelle 2
Etape 1	Sélection d'une transaminase capable de convertir le HMF en HMFA	Sélection d'un catalyseur d'oxydation capable d'oxyder sélectivement le HMF en AFCA
Etape 2	Sélection d'un catalyseur d'oxydation capable d'oxyder le HMFA en AMFC	Sélection d'une transaminase capable de convertir l'AFCA en AMFC
Défis communs	Ajustement des conditions réactionnelles pour permettre aux deux catalyseurs de fonctionner efficacement dans le même milieu	

L'étude de ces deux chemins réactionnels conduisant au développement d'un procédé hybride 1P2S sera étudiée dans la première partie (chapitres 1 et 2) de cette thèse. Le chapitre 1 s'emploiera à caractériser les différents catalyseurs chimique et biologique pour sélectionner la meilleure voie. Le chapitre 2 se focalisera sur l'élaboration du procédé hybride sélectionné au travers du chemin choisi. Il mettra également en lumière les limitations pour envisager le développement d'un procédé 1P1S.

La seconde grande partie (chapitres 3 et 4) s'emploiera à étudier le développement d'un procédé hybride 1P1S. Dans ce cas, le défi principal réside dans la mise au point des conditions réactionnelles favorisant le fonctionnement des deux catalyseurs dans le même pot réactionnel. Effectivement, les transaminases travaillent généralement en conditions douces (température 30-70 °C, milieux aqueux tamponnés) tandis que les catalyseurs chimiques travaillent en conditions plus dures (solvant organique, température supérieure à 100 °C). Le Tableau 6 présente les défis identifiés pour la synthèse directe de l'AMFC au travers de la mise au point d'un procédé hybride 1P1S.

Tableau 6 : Défis identifiés pour la synthèse directe de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique à partir du HMF au travers de la mise place d'un procédé hybride 1P1S.

Défis

Défis	Sélection d'un catalyseur d'oxydation capable d'opérer sur le HMF et sur le HMFA
	Sélection d'une transaminase capable de convertir l'ensemble des produits d'oxydation du HMF possédant une fonction aldéhyde
	Ajustement des conditions réactionnelles pour permettre aux deux catalyseurs de fonctionner efficacement dans le même milieu

Il faudra donc vérifier si les catalyseurs chimiques peuvent travailler en milieux aqueux à des températures comprises entre 30 et 70 °C ou si parmi la diversité des transaminases existantes, certaines peuvent travailler dans des conditions similaires à celles des NPs supportées. Afin d'optimiser notre réaction, la notion de recyclabilité est à prendre à compte.

Comme constatée dans l'étude bibliographique, la présence de deux catalyseurs de nature différente dans le même milieu réactionnel peut mener à des problèmes d'inhibitions mutuels. Ces problèmes peuvent provenir du catalyseur en lui-même ou des réactifs nécessaires aux deux réactions. Une des solutions potentielles est donc une immobilisation du biocatalyseur. Ajoutons à cela que, si les deux catalyseurs sont présents en même temps dans le milieu réactionnel, une compétition réactionnelle est à envisager (voie 1 et/ou 2, Figure 16). S'il s'avère que la transamination est plus efficace cinétiquement, le catalyseur chimique aura un seul substrat à transformer : le HMFA. Mais à contrario, si l'oxydation est plus efficace, plusieurs molécules possédant une ou deux fonctions aldéhydes (DCAF, AFCA) seront potentiellement présentes au sein du milieu réactionnel. La sélection d'une transaminase capable d'opérer sur tous les dérivés d'oxydation est donc nécessaire afin de limiter les sous-produits non désirables (HFCA, FDCA) qui pourraient limiter le rendement final en furfurylamines.

Le chapitre 5 s'emploiera à décrire et valider la preuve de concept pour la synthèse d'un matériau multicatalytique hybride pour l'obtention directe de l'AMFC à partir du HMF. Enfin, la dernière partie (chapitre 6) présentera l'application des procédés hybrides développés préalablement pour la valorisation d'autres synthons d'origine biosourcée en leurs équivalents aminés. Ce chapitre permettra notamment d'ouvrir les possibilités d'accès à de nouvelles structures peu décrites jusqu'ici dans la littérature.

Chapitre 1 : Caractérisation et sélection de catalyseurs pour la synthèse directe de furfurylamines dans un procédé hybride « one-pot/two-steps »

1 Etude des biocatalyseurs pour la conversion de substrats furfuryliques

En vue de la mise au point de notre premier procédé en 1P2S, nous avons commencé par réaliser l'étude et la sélection de la meilleure transaminase à utiliser pour nos étapes de transferts d'amines. Une transaminase Q7NWX4 (*Chromobacterium Violaceum*, Cv-TA) fournie par le professeur Thierry Gefflaut, ICCF, Clermont-Ferrand, France a été sélectionnée pour débiter l'étude. Dans l'attente de pouvoir produire de nouvelles transaminases potentiellement plus efficaces (thermostables, etc.) nous avons commencé notre étude avec cette dernière en vue de la réalisation d'une première réaction hybride. Elle avait déjà été décrite comme efficace sur les composés possédant un cycle furanique ¹⁸⁶. Cette transaminase a été surexprimée, et utilisée dans un premier temps sous la forme de lysat cellulaire (*Cell free extract*, CFE).

1.1 Etude d'une transaminase pour la conversion de substrats furfuryliques

Pour débiter notre étude de cette enzyme, nous avons commencé par adapter au laboratoire le test basé sur la méthylbenzylamine (MBA). Ce test, qui est sûrement le plus communément usité, utilise donc la MBA comme donneur d'amine avec le pyruvate de sodium comme accepteur. La réaction de transamination conduit alors à la production d'acétophénone ($\epsilon = 12000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH 8) dont la formation peut être suivie par spectrophotométrie à 245 nm (Schéma 12) grâce à la conjugaison de la fonction carbonyle avec le cycle benzénique ¹⁸⁷.

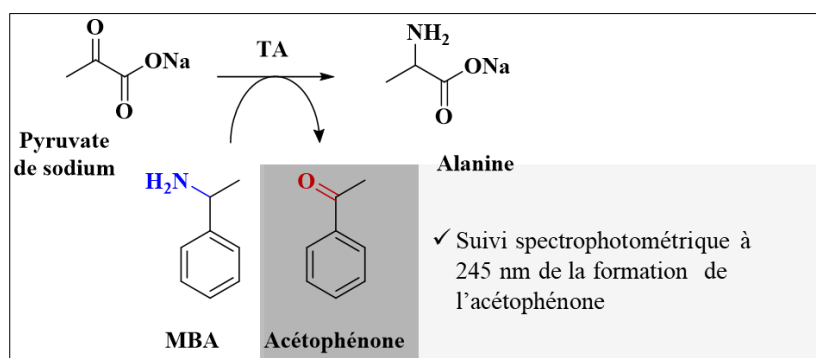


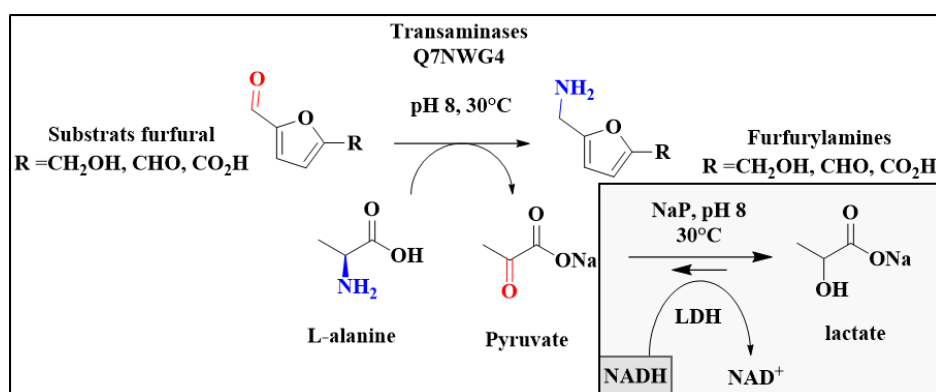
Schéma 12 : Schéma réactionnel de la réaction de transamination du pyruvate de sodium en L-alanine avec la MBA comme donneur d'amine.

Outre la possibilité d'un suivi facile de l'avancement réactionnel, ce test a été choisi, car l'utilisation de ce donneur permet de déplacer l'équilibre de la réaction et de mieux appréhender l'efficacité de la transaminase pour l'accepteur testé. L'équilibre

thermodynamique du couple méthylbenzylamine (MBA)/acetophénone est en effet largement en faveur du co-produit carbonylé ¹⁸⁸.

Une activité de 138 mU. puits⁻¹ est déterminée pour la Q7NWG4. Après avoir confirmé que la transaminase était active, nous nous sommes employés à des essais de transamination sur les différents dérivés obtenus par oxydation du HMF. Cependant l'absorbance importante des composés AFCA et DCAF à 245 nm (λ d'absorbance de l'acetophénone lors du test) ne permettent pas d'effectuer le test à la MBA. La Q7NWG4 est décrite comme étant strictement (*S*)-énantiosélective, un changement de test a donc été effectué avec un autre donneur d'amine, la L-alanine.

Ce test découplé est basé sur l'utilisation d'une lactate déshydrogénase (LDH), dont le principe est présenté ci-dessous (Schéma 13).

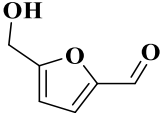
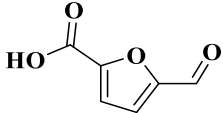
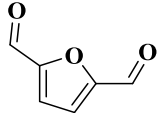
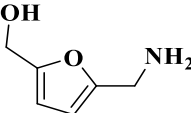
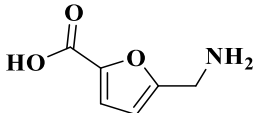
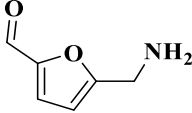
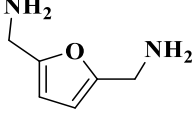


Suivi spectrophotométrique de la disparition du NADH à 340 nm

Schéma 13 : Schéma du test à la LDH pour mesurer l'activité de la Cv-TA sur différents substrats furfuryliques.

Le co-produit carbonylé formé de la L-alanine est le pyruvate, qui est lui-même réduit par la LDH en lactate. Cette seconde enzyme fonctionne grâce à un cofacteur, le NADH ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) qui est oxydé en NAD⁺ (Schéma 13). La disparition du NADH peut alors être suivie par spectrophotométrie à 340 nm ce qui permet de suivre l'avancement de la réaction. La conversion du pyruvate en lactate permet de tirer l'équilibre réactionnel vers la formation du produit aminé. L'utilisation de ce test d'activité nous permettra de déterminer si la transaminase sélectionnée (Cv-TA, Q7NWG4) possède une activité sur le HMF, l'AFCA et le DCAF. Les activités spécifiques de la Cv-TA sur les trois produits furfuryliques testés et les structures des substrats et produits formées sont résumées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Activités spécifiques mesurées de la Cv-TA sur le HMF, l'AFCA et le DCAF au travers d'un test découplé à la LDH (Tampon de phosphate de sodium 100 mM (pH 8), 2 mM de substrat, 5 U. ml⁻¹ LDH, 0,5 mg.ml⁻¹ NADH, 0,1 mM PLP, 0,1 mg.ml⁻¹ Cv-TA CFE, et 10 mM L-alanine).

Entrées	1	2	3
Substrats	HMF 	AFCA 	DCAF 
Activités (mU.mg ⁻¹)	535	715	545
Produits aminés	HMFA 	AMFC 	AMFA  FDMA 

Ces tests nous permettent donc de confirmer les possibles chemins réactionnels définis dans l'introduction. Pour le développement du procédé 1P2S, les deux chemins réactionnels seraient possibles (voies 1 et 2, Figure 16) avec la confirmation de l'activité de la Cv-TA sur le HMF et l'AFCA (respectivement 535 et 715 mU.mg⁻¹) qui forment respectivement du HMFA et de l'AMFC. De plus l'activité obtenue sur le DCAF nous indique que la transaminase sélectionnée est active sur tous les produits furfuryliques qui possèdent une fonction aldéhyde. Il est important de noter que le produit de transamination du DCAF peut être le composé AMFA ou FDMA, ou un mélange des deux. Ce test ne nous permet pas de discriminer entre les deux. Nous pouvons donc supposer que lors de la mise en œuvre des procédés hybrides avec la Q7NWG4, si le biocatalyseur est toujours actif dans les conditions définies, nous pouvons affirmer que la transaminase sélectionnée sera active sur les différents produits d'oxydation du HMF qui mènent à des furfurylamines.

1.2 Immobilisation de la Cv-TA

Une fois notre transaminase sélectionnée, nous nous sommes intéressés à son immobilisation sur un support solide. La sélection de ce support nous permettra potentiellement

d'augmenter la recyclabilité du biocatalyseur et de parer à de potentiels empoisonnements croisés avec les NPs métalliques supportées. Le support EziGTM (EnginZyme AB, Suède) est décrit par Cassimjee *et al.* comme un support d'immobilisation enzymatique efficace pour les transaminases, leur conférant notamment une stabilité augmentée dans les solvants organiques¹⁸⁹. Son utilisation est très simple à mettre en œuvre, l'immobilisation s'effectuant par adsorption spécifique de la protéine grâce à son tag 6x-His. En effet les doublets non liants des atomes d'azotes présents sur le groupement imidazole des histidines du tag vont pouvoir venir chélaté les ions Fe²⁺ présents sur la surface des billes EziGTM via des liaisons faibles. De plus, sa spécificité d'adsorption envers la protéine taguée permet une incubation directe avec le lysat cellulaire pour une immobilisation directe de l'enzyme d'intérêt. Cette méthode d'immobilisation nous évite donc une étape de purification enzymatique.

1.2.1 Sélection du ratio d'immobilisation sur les trois supports EziGTM.

L'immobilisation de la Cv-TA a été étudiée sur trois types de supports EziGTM : OPAL, AMBER et CORAL. Ces trois supports se différencient par la nature du polymère qui les recouvre. Le support OPAL est hydrophile (recouvert de polyacrylonitrile), le support AMBER est semi-hydrophile (recouvert d'un copolymère de styrène et d'acrylonitrile) et le support CORAL est hydrophobe (recouvert de chlorure de polyvinylbenzyle). La Figure 17 montre le taux d'immobilisation de la Cv-TA en fonction du ratio enzyme/support. Le lysat cellulaire contenant la Cv-TA a été incubé avec le support pendant 1 h en milieu tamponné (phosphate de sodium, pH 8, 100 mM) et la quantité de protéines présente dans le surnageant a été dosée par la méthode de Bradford. Les trois supports possèdent une capacité d'adsorption protéique similaire, quel que soit le rapport protéines/support (p/p ; en mg) testé : environ 35 % pour le rapport 1/1, 50 % pour le rapport 1/3, 70 % pour le rapport 1/6. Les trois derniers ratios (1/9, 1/12 et 1/15) ne présentent pas de différences significatives avec un taux d'immobilisation qui varie entre 75 % et 85 % pour les trois supports. Afin de limiter la consommation de supports et la quantité d'enzyme, le ratio, 1/3 a été sélectionné pour la suite des manipulations. Comme il sera montré par la suite ce ratio s'est avéré être suffisant pour maintenir l'activité enzymatique nécessaire pour nos transformations.

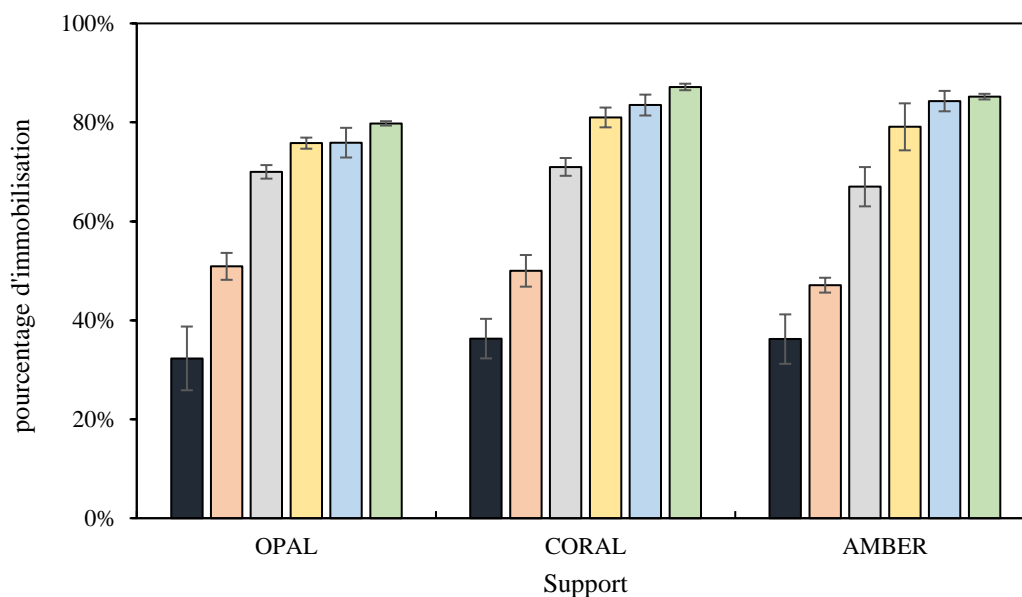


Figure 17 : Pourcentages de protéines immobilisées sur EziG™OPAL, EziG™CORAL et EziG™AMBER à température ambiante pour 6 rapports protéines/support différent (p/p, en mg) : 1:1 (■), 1:3 (□), 1:6 (□), 1:9 (□), 1:12 (□), et 1:15 (□).

1.2.2 Cinétique d'immobilisation de la Cv-TA sur les supports EziGTM

Nous avons ensuite étudié la cinétique d'immobilisation de la Cv-TA. La quantité d'enzyme immobilisée a alors été suivie au cours du temps à intervalles réguliers par dosage de Bradford du surnageant. La Figure 18 présente la cinétique d'immobilisation de la Cv-TA sur les trois supports OPAL, CORAL et AMBER. Le support OPAL possède une capacité de fixation légèrement plus efficace que les supports CORAL et AMBER avec 60 % d'immobilisation au bout de 60 min d'incubation contre 48 % pour AMBER et 50 % pour CORAL. Cependant, comme nous l'avons observé précédemment, les trois supports possèdent globalement la même capacité de fixation avec un taux d'immobilisation qui varie entre 60 et 65 % au bout de 180 min d'incubation. Dans le cas de l'OPAL, aucune évolution significative n'est observée après 60 min (environ 60 % à 120 et 180 min). Les paramètres suivants sont donc retenus pour la suite des manipulations : 60 min d'incubation à température ambiante avec un ratio protéines/support de 1/3 (p/p, mg).

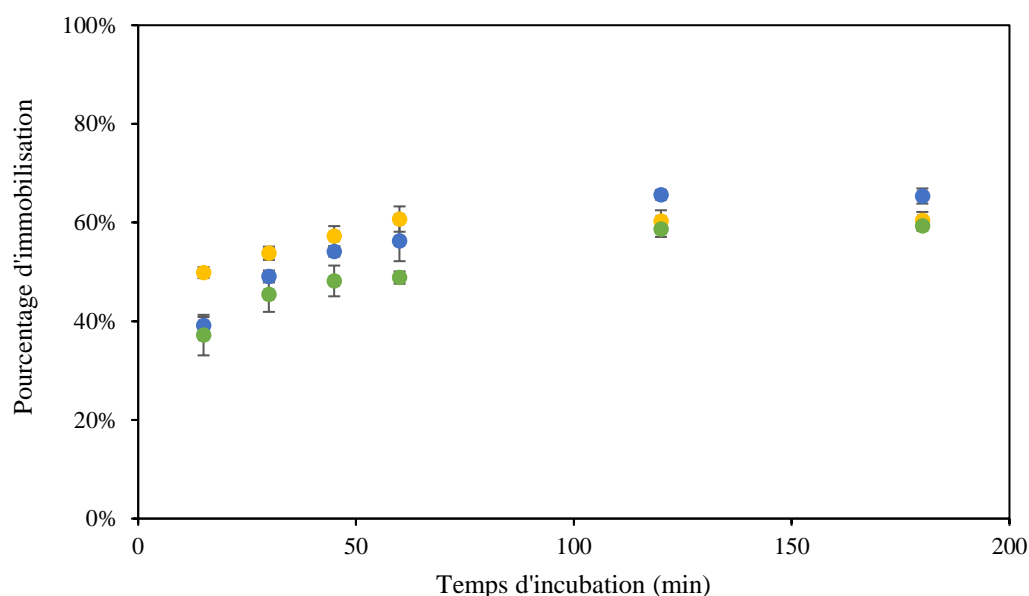


Figure 18 : Pourcentage de protéines immobilisées sur EziG™OPAL (●), EziG™Amber (●) and EziG™ Coral (●) à température ambiante avec un ratio 1 : 3 (p/p, mg) à 15, 30, 45, 60, 120 et 180 min.

1.2.3 Transamination du HMF et de l'AFCA avec la Cv-TA immobilisée

Une cinétique de réaction de transamination du HMF et de l'AFCA est ensuite effectuée avec la Cv-TA immobilisée afin de choisir le support le plus performant. Le test à la LDH est utilisé pour mesurer l'activité de l'enzyme immobilisée. Dans la mesure où dans le cas présent le test est réalisé de manière découplée, par prélèvement de milieu réactionnel, et dosage de la quantité de pyruvate produite par la LDH, il ne permet plus de déplacer l'équilibre de la transamination. Aussi il est normal que les rendements atteints ne soient pas optimaux, puisque liés à l'équilibre thermodynamique des couples Alanine+HMF/Pyruvate+HMFA et Alanine+AFCA/Pyruvate+AMFC, et ce test sert donc principalement à étudier la cinétique de l'enzyme en début de réaction. Il est aussi intéressant d'observer que durant l'incubation, les billes prennent une couleur jaune même quand la Cv-TA n'est pas présente dans le milieu. Cette couleur est due à l'adsorption du PLP directement sur le support. Après 10 min, dans le cas du HMF (Figure 19) une conversion de 48 % est observée avec le support OPAL contre 36 et 38 % avec les supports CORAL et AMBER respectivement. Après 60 min, les trois supports atteignent une conversion d'environ 50 %. Si l'on compare la TA immobilisée avec sa forme libre, on peut également constater que dans le premier cas la cinétique de transamination est plus efficace (50 % en 30 min contre 43 % lorsque l'enzyme est libre).

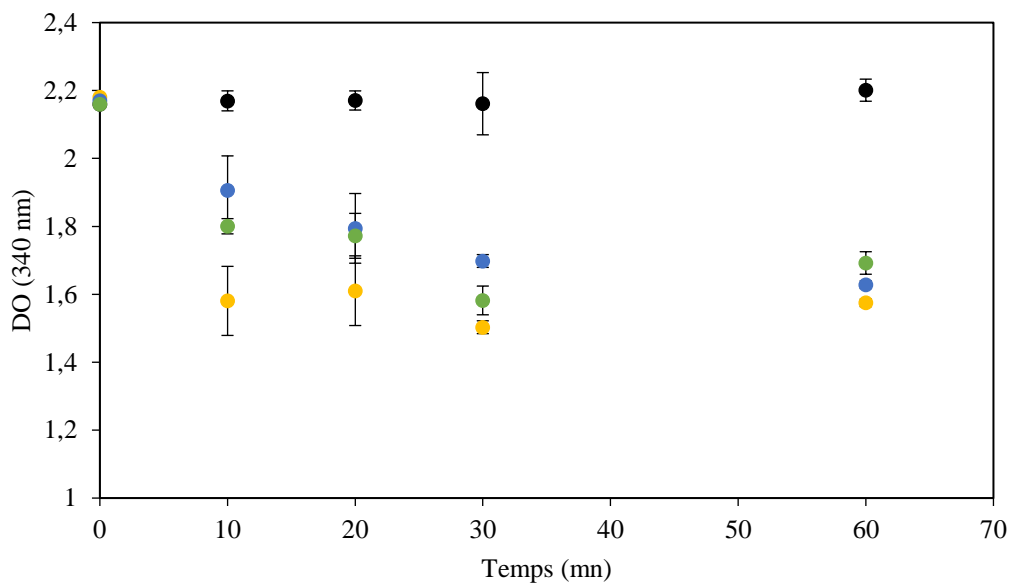


Figure 19 : Activités de *Cv*-TA@EziG™OPAL (●), *Cv*-TA@EziG™AMBER (●), *Cv*-TA@EziG™CORAL (●), et le blanc correspondant sans enzyme (●) sur le HMF à 30 °C. L'avancement de la réaction a été suivi spectrophotométriquement à 340 nm (disparition du NADH, test découplé à la LDH).

De la même manière, dans le cas de l'AFCA (Figure 20), le meilleur support est EziG™OPAL, avec 41 % de conversion de l'AFCA en AMFC en 60 minutes à 30 °C.

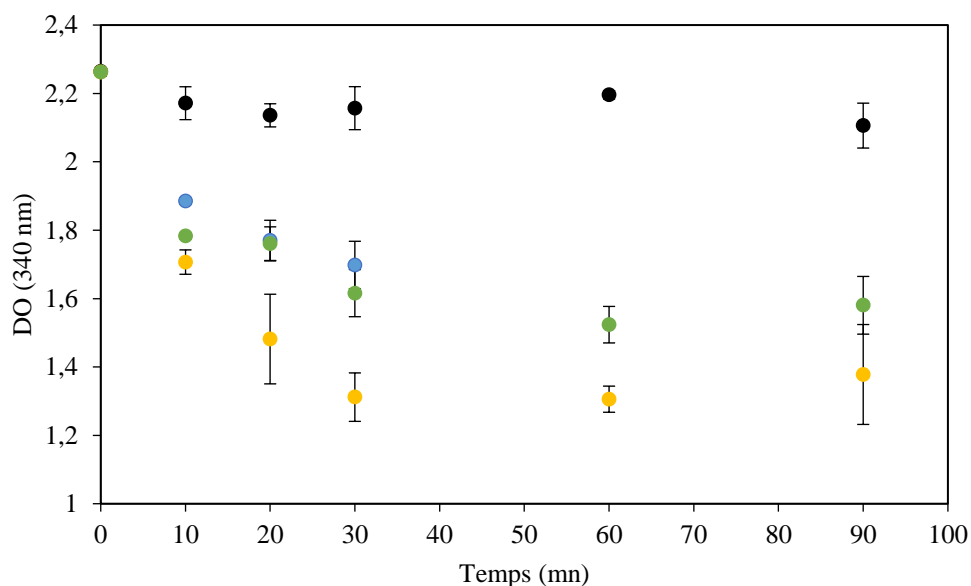


Figure 20 : Activités de Cv-TA@EziG™OPAL (●), Cv-TA@EziG™ AMBER (●), Cv-TA@EziG™CORAL (●), et le blanc correspondant sans enzyme (●) vers AFCA à 30 °C. L'avancement de la réaction a été suivi spectrophotométriquement à 340 nm (disparition du NADH, test découplé à la LDH).

Là encore, on constate également que la conversion de l'AFCA en AMFC est deux fois plus rapide lorsque l'enzyme est immobilisée : il faut seulement 30 minutes pour atteindre 61 % de conversion dans le cas de l'enzyme immobilisée, alors qu'il en faut 60 avec l'enzyme libre. Une des explications à cette différence pourrait résider en la saturation du support EziG en PLP, le rendant peut-être plus accessible à la transaminase que lorsqu'il est sous forme soluble dans le milieu. Nous pouvons également supposer que l'immobilisation sur support OPAL permet un repliement favorable de la protéine, et donc, une accessibilité facilitée du substrat au site actif.

Ainsi, en conclusion, le support OPAL, en plus d'avoir une capacité d'immobilisation plus efficace que les deux autres supports, permet une conversion plus efficace du HMF et de l'AFCA comparée à l'enzyme libre. Le fait que le support OPAL soit le plus performant peut peut-être s'expliquer par la nature hydrophile du polymère qui recouvre les billes de silice, fournissant ainsi un environnement favorable à l'enzyme en milieux aqueux. Les deux autres supports, qui sont hydrophobe et semi-hydrophobe, sont donc moins adaptés dans ce type d'environnement. Afin de confirmer ces hypothèses, des essais de transaminations avec une

augmentation graduelle de pourcentage en co-solvant (type DMSO) pourraient être effectués afin de déterminer si la présence d'un solvant organique permet d'observer une meilleure activité avec les supports CORAL et AMBER et une activité diminuée avec le support OPAL. Dans le cadre de nos manipulations, le support retenu est donc le support EziGTM@OPAL.

1.2.4 Recyclabilité de la Cv-TA@EziGTMOPAL

Pour déterminer la recyclabilité de la Cv-TA@EziGTMOPAL, nous avons utilisé un ratio (*S*)-MBA : AFCA de 1 : 1 (mol). Ce donneur a été sélectionné pour sa capacité à tirer la réaction vers le produit aminé (équilibre thermodynamique favorable) comme énoncé précédemment et ainsi déterminer le temps de réaction nécessaire pour obtenir une conversion complète du substrat. Cela nous a donc permis d'obtenir une conversion totale du substrat initial en 5 h de réaction lors du premier cycle (Figure 21).

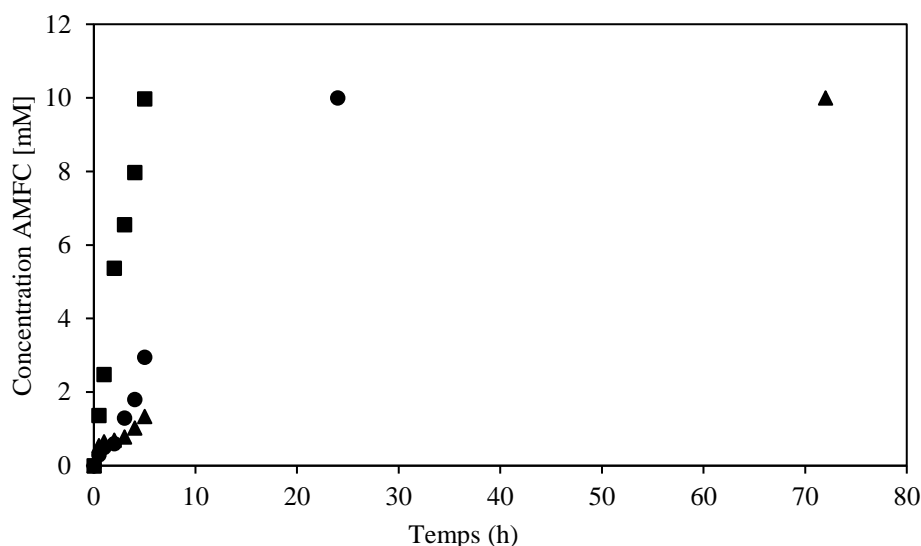


Figure 21 : Conversion de l'AFCA en AMFC obtenu au cours de 3 cycles d'utilisation de l'OPAL Cv-TA@EziGTM : cycle 1 (■), cycle 2 (●) et cycle 3 (▲). La concentration en AMFC a été mesurée à 245 nm par HPLC-DAD après 0,5, 1, 2, 3, 4 et 5 h (cycle 1), ainsi que 24 h (cycle 2) et 72 h (cycle 3).

Le second cycle de transamination a été réalisé après que la Cv-TA@EziGTMOPAL a été maintenue à 4 °C dans une solution tamponnée (pH 8, phosphate de sodium, 100 mM) pendant 16 h. Seulement 30 % de conversion ont été obtenus en 5 h, et la conversion totale a pu être obtenue après 24 h. Ceci montre l'instabilité de la Cv-TA, même lorsqu'elle est immobilisée sur support solide. Un dernier cycle a été effectué juste après le deuxième cycle de transamination (ré-incubation directe du catalyseur, sans maintien à 4 °C). Nous obtenons

seulement 13 % de conversion après 5 h de réaction et la conversion totale a pu être obtenue après 72 h. Par conséquent, l'immobilisation de la Cv-TA sur EziGTMOPAL ne semble être réellement avantageuse que pour la récupération facile du biocatalyseur et une séparation simplifiée des produits de la réaction. Malgré cela, le maintien d'une partie de l'activité sur plusieurs cycles laisse espérer la possibilité à terme d'effectuer plusieurs cycles hybrides, après optimisation, ou potentiellement immobilisation sur un autre support.

1.2.5 Influence du pH sur l'activité de la Cv-TA libre et immobilisée.

Afin de caractériser au mieux notre système, nous avons également étudié l'influence du pH sur l'activité de la Cv-TA libre et immobilisée sur le HMF seul. En effet, dans les études précédentes, nous avons utilisé un tampon phosphate de sodium à pH 8 pour la mise en œuvre des transaminases. Cependant, la réaction d'oxydation par catalyse hétérogène en phase liquide nécessite souvent des pH plus élevés et l'utilisation d'une base. Nous avons donc effectué des réactions de transamination à pH 8 et 9 avec la Cv-TA libre et immobilisée au travers d'un test à la (*S*)-MBA afin de déterminer si l'enzyme possédait une activité à des pH supérieurs à 8.

La Figure 22 représente l'évolution de la DO à 245 nm (formation de l'acétophénone) en fonction du temps aux pH 8 et 9. Lors de l'essai avec la Cv-TA libre, une conversion de 78 % est observée en 45 min à pH 8. Aucune conversion n'est observée lorsque la réaction est effectuée à pH 9. Lorsque la réaction est effectuée avec la Cv-TA@EziGTMOPAL (Figure 23), la même tendance est observée. Une conversion de 60 % est obtenue en 45 min lorsque la réaction a lieu dans le tampon pH 8, mais aucune conversion n'est observée dans le tampon pH 9. Cela signifie donc que l'immobilisation ne permet pas à l'enzyme d'être plus résistante à des pH supérieurs à 8.

Au vu de ces résultats, quelle que soit la voie mécanistique sélectionnée, un pH 8 ou inférieur sera nécessaire afin de permettre au biocatalyseur de fonctionner efficacement. Cela implique donc que le criblage des catalyseurs chimiques devra s'effectuer dans les conditions de fonctionnement de la transaminase (milieu aqueux tamponné à pH 8).

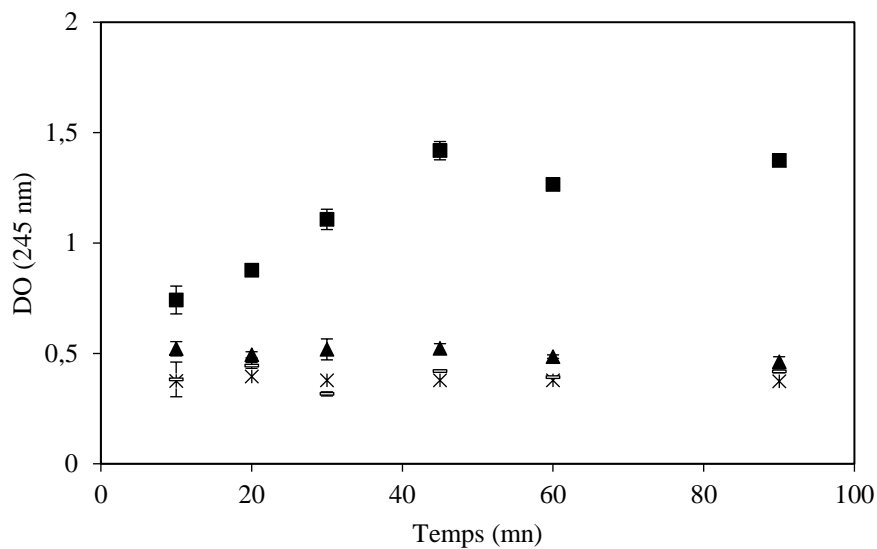


Figure 22 : Cinétique de transamination du HMF en HMFA par la Cv-TA dans le tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 8 (■) et 9 (▲) avec les deux blancs correspondant sans enzyme à pH 8 (*) et 9 (□). Suivi de la formation de l'acétophénone à 245 nm.

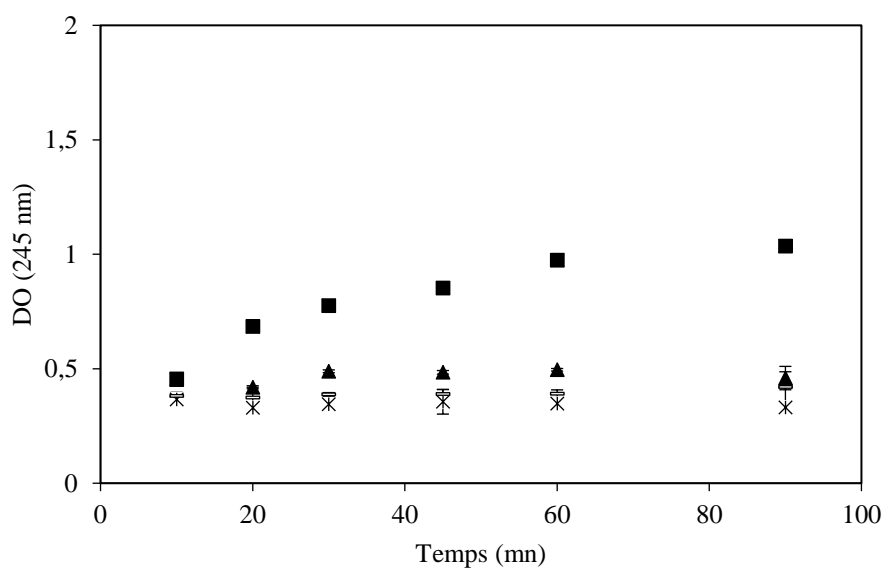


Figure 23 : Cinétique de transamination du HMF en HMFA par la Cv-TA@EziG™OPAL dans deux tampons phosphate de sodium 100 mM à pH 8 (■) et 9 (▲) avec les deux blancs correspondants sans enzyme à pH 8 (*) et 9 (□). Suivi de la formation de l'acétophénone à 245 nm.

1.2.6 Influence de la température sur la conversion du HMF/AFCA par la Cv-TA libre et immobilisée

Nous avons étudié l'influence de la température sur l'activité enzymatique de la Cv-TA libre et immobilisée. La température est l'un des paramètres clés pour la mise au point d'un procédé hybride 1P1S. Les NPs supportées effectuent de manière générale des réactions de catalyse à des températures supérieures à 100 °C. Nous devons donc déterminer si l'enzyme sélectionnée est capable de travailler à des températures plus élevées et, comme il sera testé plus tard, si nous pouvons abaisser la température de fonctionnement des NPs. L'activité de la TA a été testée à 60 °C via le test découplé à la LDH (Schéma 14). Cette température a été sélectionnée, car comme il sera vu plus tard, elle s'est avérée suffisante pour permettre aux NPs supportées d'avoir une activité catalytique sur le HMF et le HMFA. L'étude de la réaction de transamination est effectuée avec les deux substrats HMF et AFCA, pour à la fois confirmer le comportement de l'enzyme et avoir des données sur les deux voies réactionnelles envisagées dans l'introduction.

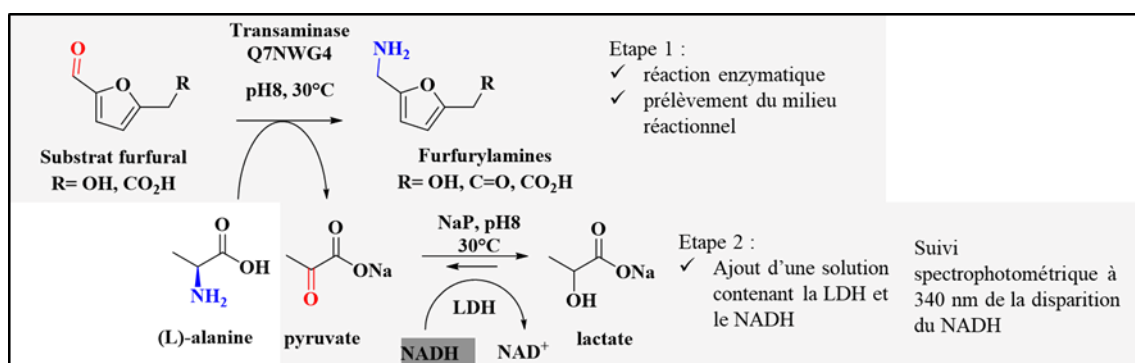


Schéma 14 : Test à la LDH découplé pour mesurer l'activité de la Cv-TA sur différents substrats furfuryliques à 30 et 60 °C.

Dans le cas du HMF, la Figure 24 montre la cinétique de réaction pour la Cv-TA libre à 30 et 60 °C. Une conversion de 53 % est obtenue avec la Cv-TA libre à 30 °C après 90 min de réaction contre 31 % à 60 °C obtenus en 90 min. De plus, dans le cas du test à 60 °C, cette conversion est obtenue en 15 min. Au-delà de ce palier, aucune décroissance de la DO n'est observée, ce qui laisse suggérer une inactivation de l'enzyme. De la même manière, l'activité de la Cv-TA@EzigTMOPAL est mesurée à 30 C et 60 °C sur le HMF (Figure 25). Similairement à l'activité observée avec la Cv-TA, une conversion est observée dans les 15 premières minutes

d'incubation à 60 °C (45 %). Lorsque ce palier est dépassé, aucune évolution de la DO n'est observée. A 30 °C, 51 % de conversion sont obtenus en 60 min de réaction.

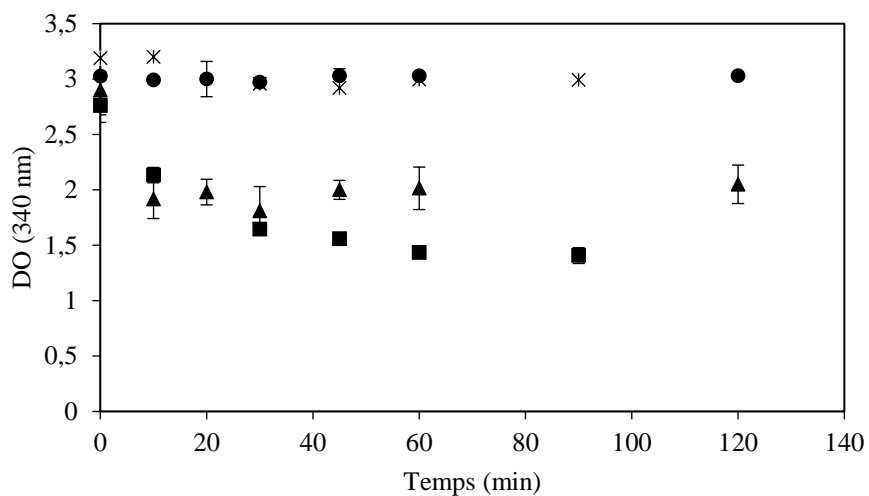


Figure 24 : Cinétique de transamination du HMF en HMFA par la Cv-TA à 30 et 60 °C. Suivi de la disparition du NADH à 340 nm pour l'enzyme libre à 30 °C (■), blanc (sans enzyme) à 30 °C (*), l'enzyme libre à 60 °C (▲) blanc (sans enzyme) à 60 °C (●).

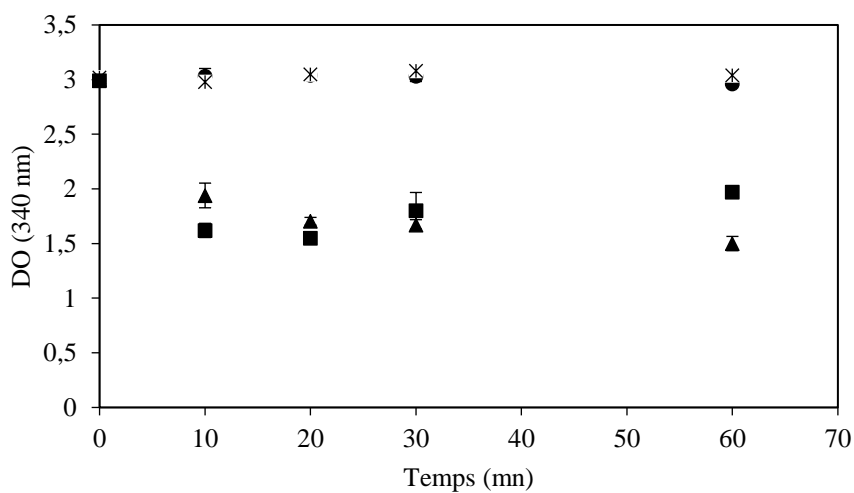


Figure 25 : Cinétique de transamination du HMF en HMFA par la Cv-TA@EziG™OPAL à 30 et 60 °C. Suivi de la disparition du NADH à 340 nm à 30 °C (▲), blanc (sans enzyme) à 30 °C (*), à 60 °C (■) blanc (sans enzyme) à 60 °C (●).

Dans le cas de l'AFCA, l'activité de la Cv-TA est testée à 60 °C (libre et immobilisée, respectivement Figure 26 et Figure 27) dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Lorsque l'enzyme est libre, après 90 minutes de réaction, nous obtenons une conversion de 43 % de l'AFCA en AMFC à 60 °C contre 62 % de conversion à 30 °C. L'absence de conversion totale à 30 °C est pour rappel dû à l'équilibre thermodynamique entre le donneur d'amine (L-alanine) et le produit carbonylé formé (pyruvate). Dans le cas où la Cv-TA est immobilisée, seulement 37 % de conversion ont été observés après 60 minutes d'incubation à 60 °C. De plus, 34 % sont observés au bout de seulement 10 minutes, confirmant l'instabilité de la Cv-TA à 60 °C même immobilisée. Cependant, au-delà de ce temps réactionnel, aucune variation de DO n'est observée laissant supposer une inactivation de l'enzyme même immobilisée. De plus une décoloration des billes, passant de jaune à blanche, tend à confirmer cette hypothèse. La couleur blanche pourrait correspondre à l'inactivation enzymatique corrélée au détachement (et/ou dégradation) du PLP préalablement immobilisé sur le support.

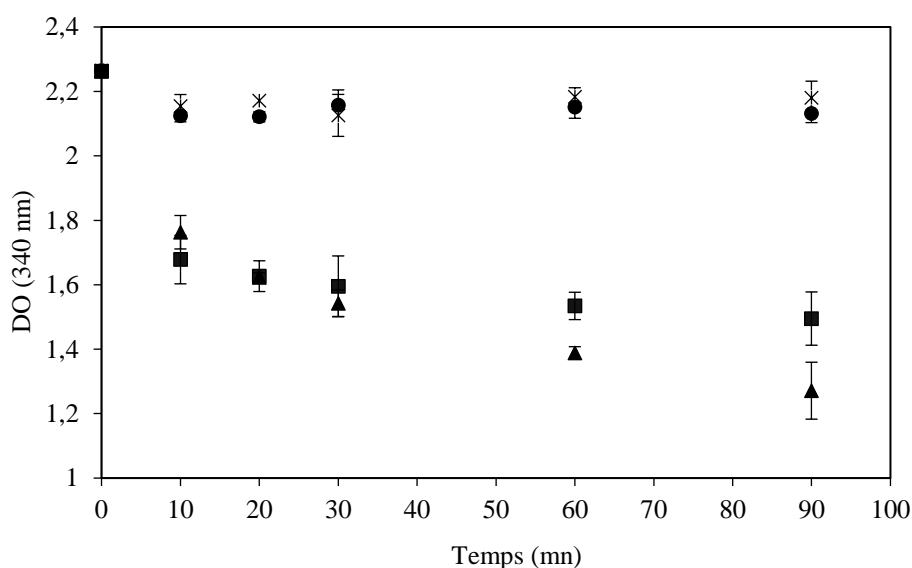


Figure 26 : Cinétique de transamination de l'AFCA en AMFC par la Cv-TA à 30 et 60 °C. Suivi de la disparition du NADH à 340 nm pour l'enzyme libre à 30 °C (▲), blanc (sans enzyme) à 30 °C (*), l'enzyme libre à 60 °C (●) blanc (sans enzyme) à 60 °C (■).

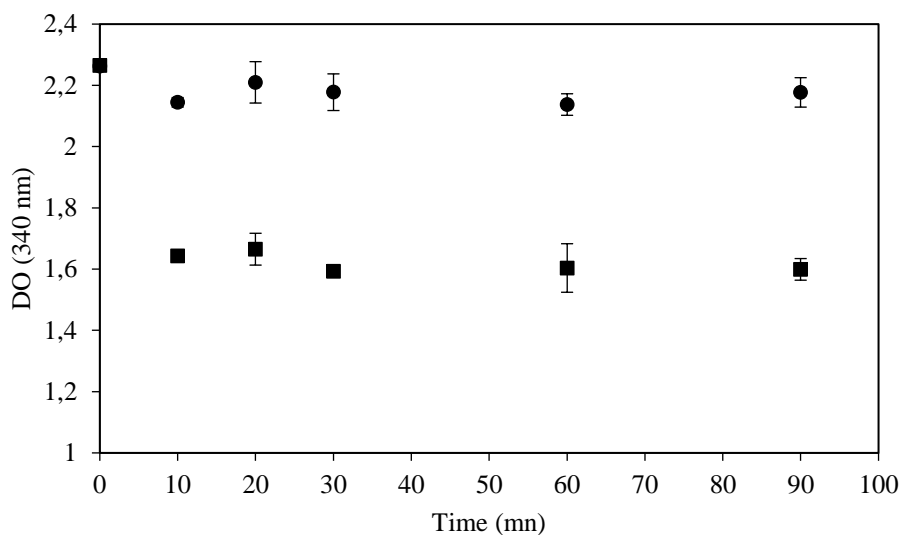


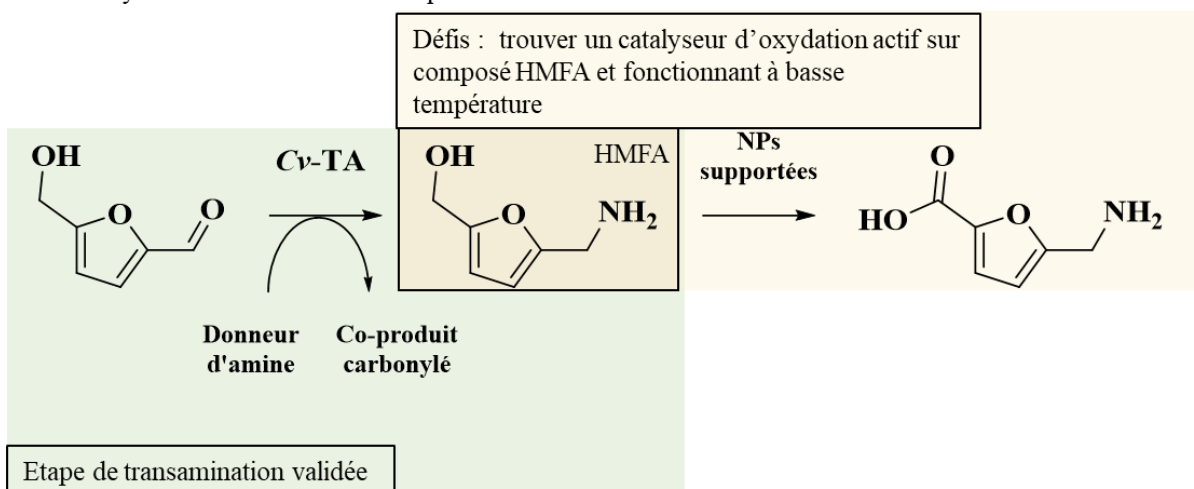
Figure 27 : Activités de la Cv-TA@EziG™ OPAL (■) sur l'AFCA à 60 °C, et le blanc correspondant sans enzyme (●). L'avancement de la réaction a été suivi avec le test découplé à la LDH.

Dans le cas des deux substrats, la formation d'un précipité blanchâtre (enzyme libre et immobilisée) dans le milieu à 60 °C laisse suggérer une dénaturation rapide de l'enzyme. Aucun précipité n'est observé dans le milieu à 30 °C. Ces résultats montrent l'instabilité de la Cv-TA libre à 60 °C. L'immobilisation de la Cv-TA sur support solide n'aide donc pas à la protéger d'une dénaturation thermique. Malgré une conversion relativement importante des substrats, une dénaturation rapide est observée, ce qui ne permet pas de l'introduire directement dans le milieu à 60 °C dans l'optique d'un procédé hybride 1P1S.

2 Conclusion intermédiaire

En conclusion, le support OPAL a été sélectionné pour réaliser l'immobilisation enzymatique qui sera mise en œuvre dans notre procédé hybride. Cette immobilisation permettra notamment de faciliter la récupération enzymatique et la séparation des produits finaux. De plus il présente la meilleure activité de conversion sur les substrats HMF et AFCA. La Cv-TA a montré son incapacité à fonctionner à des pH supérieurs à 8. Comme un pH plus élevé est généralement utilisé pour des réactions d'oxydation en phase liquide, nous avons choisi de ne pas descendre le pH et de garder 8. De plus, afin d'éviter toute compétition entre le catalyseur chimique et la transaminase, il est décidé d'effectuer l'étape de transamination à température ambiante. Dans un second temps, compte tenu de la perte d'activité significative de la Cv-TA à 60 °C, il est décidé de garder 30 °C pour la température de transamination. Ces résultats nous permettent d'affirmer que l'implémentation d'un procédé 1P1S ne sera pas possible avec l'utilisation de la Q7NWG4. Sa dénaturation trop rapide (environ 15 min) à 60 °C ne nous permet pas d'introduire le biocatalyseur directement à cette température dans l'optique d'un procédé 1P1S. Pour mettre au point un tel procédé, nous aurons besoin d'une enzyme stable et active thermiquement. A ce stade et au vu des résultats, le développement d'un procédé hybride 1P2S paraît donc plus vraisemblable. Comme la Cv-TA a démontré sa capacité à convertir à la fois l'AFCA et le HMF en AMFC et HMFA, le criblage de catalyseur sur le HMFA et sur l'AFCA déterminera donc de quelle manière implémenter le procédé hybride. Le rappel des voies réactionnelles ainsi que les défis inerrants sont disponibles en Figure 28.

Procédé Hybride 1P2S Voie mécanistique 1 :



Procédé Hybride 1P2S Voie mécanistique 2 :

Défis : trouver un catalyseur d'oxydation sélectif du composé AFCA et fonctionnant à basse température

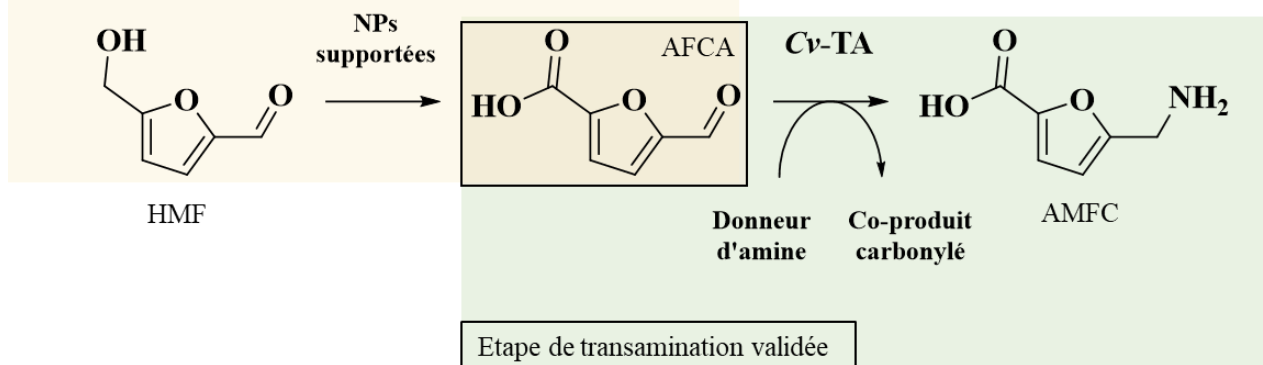


Figure 28 : Récapitulatif des voies réactionnelles envisagées pour le développement d'un procédé hybride 1P2S pour la synthèse directe d'AMFC à partir du HMF.

3 Criblage de catalyseurs hétérogènes chimiques

Avant de nous intéresser au criblage des catalyseurs hétérogènes d'oxydation chimiques, nous avons au préalable réalisé la caractérisation de l'ensemble des produits intermédiaires et finaux pouvant apparaître au cours des réactions mises en jeu, de manière à pouvoir les suivre, notamment par la mise au point d'une méthode HPLC. La synthèse des différents standards aminés a été effectuée. Le HMFA, l'AMFA et l'AMFC sont synthétisés à partir de leurs équivalents carbonylés, respectivement le HMF, le DCAF et l'AFCA.

3.1 Synthèse des standards

Le HMFA et l'AMFC ont ainsi été obtenus purs avec un rendement >99 % sous forme respective d'une huile jaune et d'un solide jaunâtre. La structure de l'AMFA a pu être confirmée par RMN, mais sa purification n'a pas encore pu être réalisée.

3.1.1 Synthèse du HMFA

La synthèse du HMFA s'est effectuée directement à partir du HMF au travers d'une réaction de transfert d'amine par biocatalyse en utilisant la Cv-TA (Q7NWX4). La conversion complète du HMF est validée par HPLC-DAD et RMN ¹H.

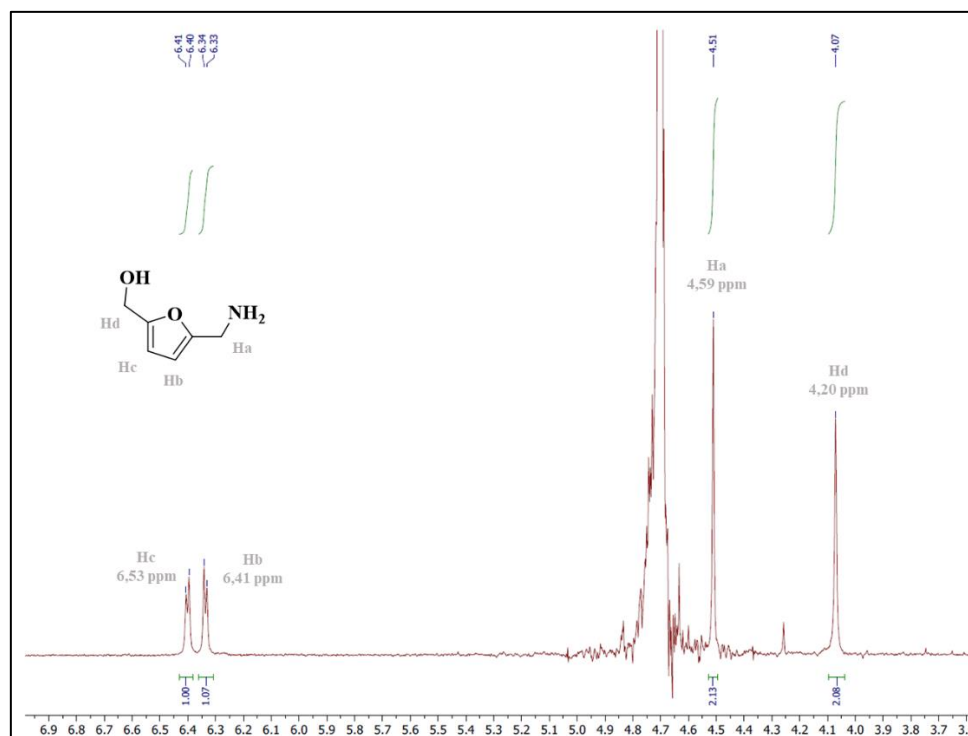


Figure 29 : Spectre RMN 1H (D2O, 300 MHz) du HMFA.

La Figure 29 présente le spectre RMN ^1H du HMFA pur obtenu. Les protons présents sur le cycle furane sont caractérisés par deux doublets présents à 6,33 et 6,40 ppm. Les protons en alpha de la fonction alcool sont visibles sous forme d'un singulet à 4,51 ppm tandis que ceux en alpha de la fonction amine sont visibles sous la forme d'un singulet à 4,07 ppm. Les autres caractérisations du HMFA (DEPT 135, DEPT45, COSY) sont disponibles en annexes A.

3.1.2 Synthèse de l'AMFA

Concernant la synthèse de l'AMFA, un rapport molaire substrat/donneur d'amine de 1/1 est effectué afin de convertir une seule des fonctions aldéhydes disponibles sur le DCAF. La réaction est suivie par HPLC.

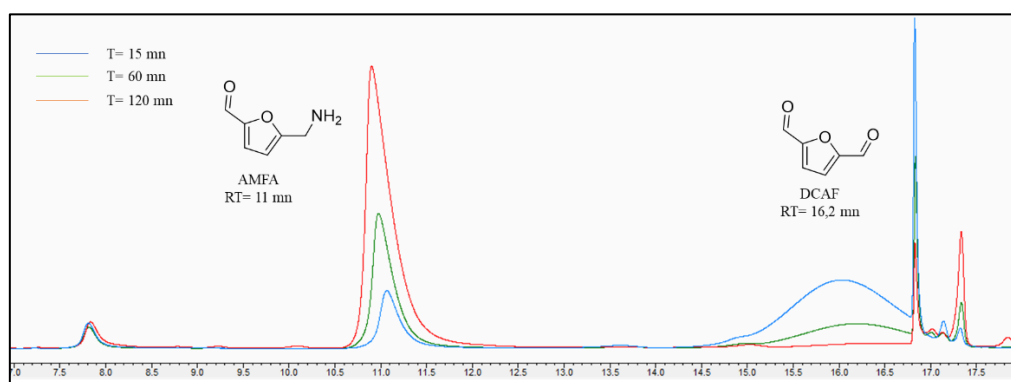


Figure 30 : Suivi HPLC-DAD à 280 nm de la réaction de transamination du DCAF en AMFA par la Cv-TA à t15 (bleu), t60 (vert) et t120 min (rouge).

Sur la Figure 30, on peut observer la disparition progressive du DCAF (RT=16,6 min) et l'apparition d'un pic majoritaire à 11 min avec une absorbance maximale à 280 nm. Cependant, un second pic apparaissant à 7,8 min et avec une absorbance maximale à 210 nm est observé. Ce pic est présumé être le FDMA. Pour le vérifier, 500 μl du milieu brut réactionnel sont prélevés pour être analysés par RMN ^1H . Après confirmation de la structure du produit, le milieu est purifié sur colonne échangeuse d'ions, cependant après plusieurs volumes de colonne à l'ammoniac 30 %, aucune trace d'un produit aminé n'est observée en sortie de colonne. Sa structure est cependant confirmée sur le spectre RMN réalisé sur l'échantillon brut réactionnel. Il est donc assumé que le pic avec un temps de rétention de 11 min sur le spectre HPLC correspond à l'AMFA.

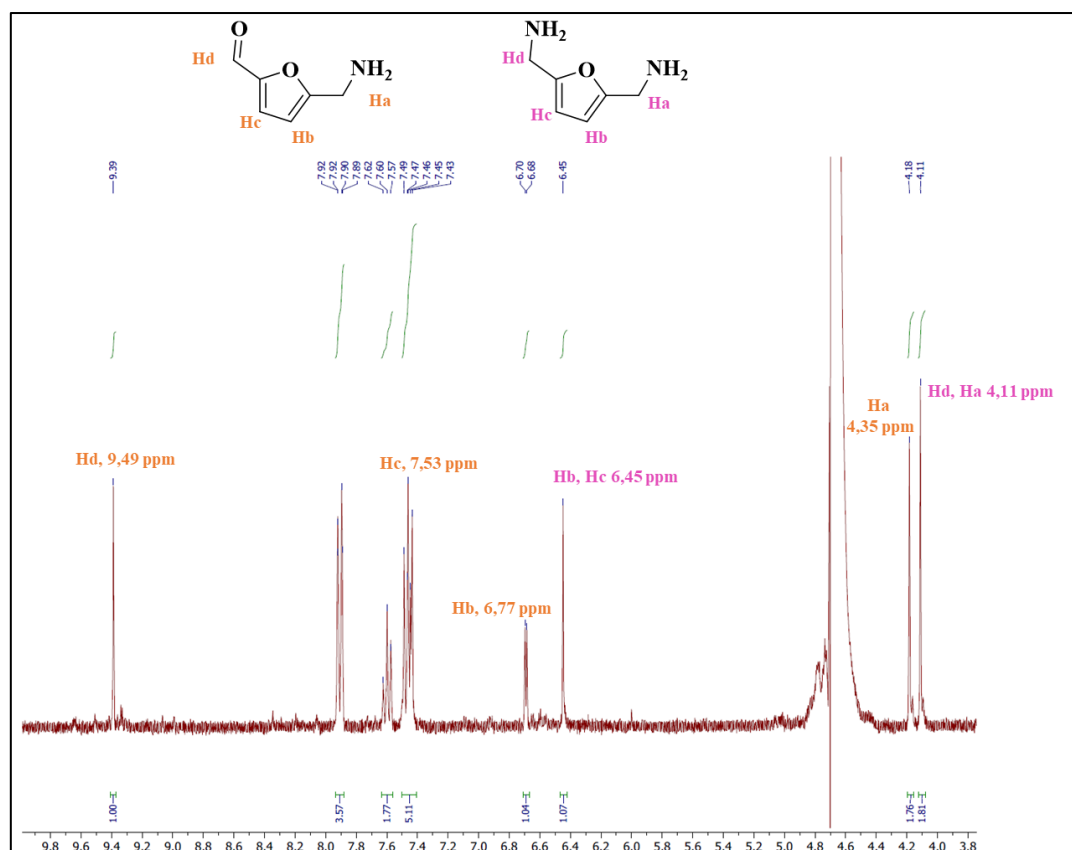


Figure 31 : RMN ^1H entre 4 et 10 ppm du milieu réactionnel de la synthèse de l'AMFA et du FDMA à partir du DCAF à 180 min.

La Figure 31 présente la RMN ^1H du milieu réactionnel brut de la synthèse de l'AMFA. Les protons du FDMA sur le cycle furanique sont visibles sous la forme d'un singulet à 6,45 ppm. Les 4 protons présents en alpha des fonctions amines sont visibles sous la forme d'un singulet à 4,11 ppm. La structure de l'AMFA est quant à elle visible tout d'abord avec le singulet caractéristique de la fonction aldéhyde à 9,39 ppm et les deux protons en alpha de la fonction amine à 4,18 ppm. Le premier proton du sur le cycle furane est visible à 6,78 ppm et le second à 7,45 ppm.

En conclusion en partant du DCAF comme substrat initial, deux produits de réaction sont observés dans le milieu réactionnel ; l'AMFA et le FDMA. Cela signifie que la Cv-TA utilisée n'est pas spécifique d'une fonction aldéhyde dans le DCAF. De ce fait l'AMFA n'a pas pu être quantifié par HPLC-DAD.

3.1.3 Synthèse de l'AMFC

La synthèse et la purification de l'AMFC ont été réalisées de la même manière que celles décrites pour le HMFA. La synthèse de l'AMFC s'est effectuée directement à partir de l'AFCA au travers d'une réaction de transfert d'amine par biocatalyse en utilisant la Cv-TA (Q7NWX4).

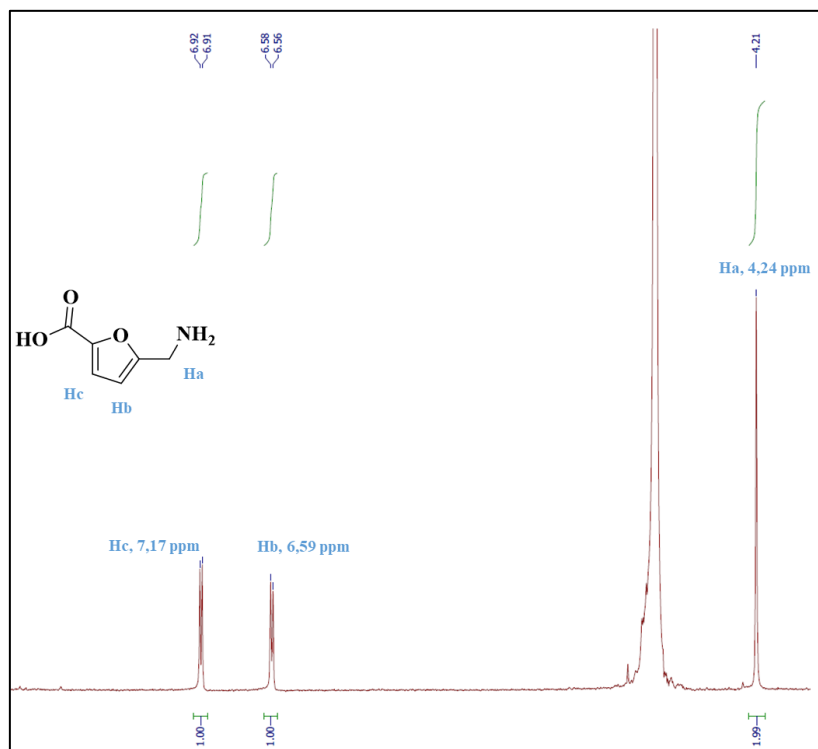


Figure 32 : Spectre RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) de l'AMFC.

Le substrat de départ utilisé ici fut l'AFCA. Après avoir confirmé la conversion complète en AMFC, ce dernier est isolé au travers d'une purification sur colonne échangeuse d'ions (DOWEX 50WX8) et caractérisé par RMN ^1H . La Figure 32 présente le spectre RMN de l'AMFC pur obtenu. L'AMFC se caractérise par deux signaux sous forme de doublets à 6,57 et 6,92 ppm qui correspondent aux deux protons portés par le cycle furanique. Le dernier pic est celui correspondant aux protons en alpha de la fonction amine qui apparaissent sous forme d'un singulet à 4,27 ppm. Les autres caractérisations sont disponibles en annexes A. Une fois les différents produits de réactions possibles en notre possession, nous nous sommes attelés aux criblages de catalyseurs, le premier pour l'oxydation du composé HMFA en AMFA et/ou AMFC et le second pour l'oxydation spécifique du HMF en AFCA.

3.2 Catalyseurs chimiques sélectionnés pour le criblage

Pour mener cette étude, 15 catalyseurs hétérogènes ont été testés. 4 métaux différents (Au, Pd, Pt et Ru) ont été immobilisés sur une variété de supports afin de tester leurs capacités à oxyder sélectivement le HMF en AFCA ainsi que leurs capacités à convertir le HMFA en AMFC. Le descriptif de ces catalyseurs est présenté dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Catalyseurs hétérogènes pour réaliser le criblage de l'oxydation du HMF et du HMFA (*déterminé par ICP).

Dénomination du catalyseur	Méthode de préparation	Pourcentage de métal*	Support
C1	Réduction-précipitation	2.3 % Au	Al ₂ O ₃
C2	Sol immobilisation	1.8 % Au	Amberlyst-15
C3	Sol immobilisation	1.6 % Au	CaO
C4	Sol immobilisation	1.6 % Au _{PVA}	CaO
C5	Sol immobilisation	1.8 % Au	CeO ₂
C6	Sol immobilisation	1.8 % Au	MgO
C7	Réduction-précipitation	1.7 % Pd	Al ₂ O ₃
C8	Sol immobilisation	0.9 % Pd	TiO ₂
C9	Imprégnation humide	6.3 % Pt	SiO ₂
C10	Imprégnation humide	1.5 % Ru	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
C11	Sol immobilisation	0.9 % Au–0,1 % Pd	TiO ₂
C12	Sol immobilisation	0.3 % Au–0,7 % Pd	ZrO ₂
C13	Co-précipitation	0.8 % Au–0,8 % Pt	TiO ₂
C14	Co-précipitation	0.7 % Pt–0,8 % Pd	Al ₂ O ₃
C15	Co-précipitation	1.0 % Pt–1,0 % Pd	TiO ₂

3.3 Criblage de nanoparticules métalliques supportées pour l'oxydation sélective du HMFA en AMFC

Au total, 15 catalyseurs métalliques hétérogènes ont été criblés sur le HMFA (Schéma 15) à petite échelle (1 mL), dans des fioles scellées en verre, afin de limiter l'évaporation.

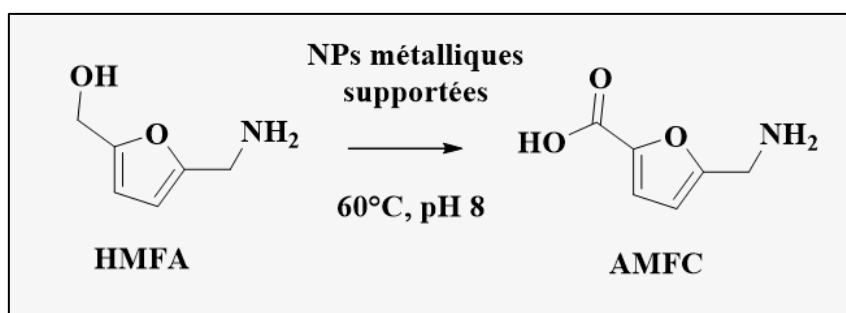


Schéma 15 : Équation bilan attendue pour l'oxydation du HMFA en AMFC.

Les catalyseurs C1, C13, C14 et C15 (entrée 1, 13, 14 et 15, Tableau 9) se sont révélés inactifs dans les conditions utilisées. Deux catalyseurs (C3 et C5, entrée 3 et 5, Tableau 9) ont oxydé une petite quantité de HMFA en AMFA. Ils génèrent respectivement 2,0 et 1,34 mM d'AMFA. Le taux de conversion reste cependant faible pour considérer ces catalyseurs comme des candidats sérieux pour la réalisation d'une catalyse « one-pot/two-steps ». Il semblerait que l'étape limitante de ces catalyseurs soit l'oxydation de la fonction alcool en fonction aldéhyde, car aucune trace d'AMFC n'est détectée dans les milieux réactionnels malgré la présence de la fonction aldéhyde après 48 h de réactions. Deux autres catalyseurs (C8 et C12, entrée 8 et 12, Tableau 9) produisent également de l'AMFA (1,04 et 1,98 mM) pour les deux. Il est intéressant de noter dans ce cas la présence de HMF (0,38 et 0,05 mM). Cela laisse supposer que certains catalyseurs soient actifs sur la fonction amine du HMFA pour la convertir en fonction aldéhyde. Cette réaction est une « désamination oxydative » et sera étudiée plus tard dans ce manuscrit. Ce type de réaction n'était pas attendue, elle mène par conséquent à un rendement inférieur en furfurylamines. L'objectif restant la production majoritaire d'AMFC, ces catalyseurs ne sont pas considérés comme des candidats potentiels.

Il semble que les deux voies réactionnelles (oxydation et désamination oxydative) soient en compétition dans le cas de plusieurs catalyseurs et oxydant même le HMF formé en dérivés d'oxydation. C'est le cas des catalyseurs C4 et C6 (entrée 4 et 6, Tableau 9) qui produisent respectivement 2,4 et 2,7 mM d'AMFC contre 2,9 et 1,3 mM de HMF. Ces catalyseurs vont

même plus loin en convertissant le HMF en AFCA dans le même milieu réactionnel (respectivement 1,07 et 3,44 mM d'AFCA). Le catalyseur C10 pousse même l'oxydation jusqu'au FDCA (1,3 mM, entrée 10, Tableau 9). La présence d'une compétition forte entre ces deux voies réactionnelles pour la seule étape d'oxydation nous empêche de considérer ces catalyseurs pour l'implémentation d'un procédé hybride 1P2S. Dans le cas de cette voie mécanistique, l'introduction des NPs supportées vient après l'étape de transamination ou le HMF est supposé être entièrement consommé. Le fait d'observer du HMF dans le milieu réactionnel serait donc un retour en arrière.

Tableau 9 : Concentration des réactifs (en mM) mesurée par HPLC-DAD pour 15 catalyseurs d'oxydations après 48 h à 60 °C dans un tampon KH_2PO_4 (pH 8, 100 mM).

Entrée	Code	HMFA	AMFA	AMFC	HMF	AFCA	FDCA	DCAF
1	C1	9,5	-	-	-	-	-	-
2	C2	7,30	1,74	0,12	0,83	-	-	-
3	C3	7,9	2,0	-	-	-	-	-
4	C4	1,23	2,43	2,36	2,90	1,07	-	-
5	C5	8,65	1,34	-	-	-	-	-
6	C6	2,66	-	2,67	1,36	3,44	-	-
7	C7	5,35	1,97	1,74	0,92	-	-	-
8	C8	8,57	1,04	-	0,38	-	-	-
9	C9	4	1,79	0,22	1,66	1,39	-	0,93
10	C10	7,50	0,44	0,02	0,73	-	1,30	-
11	C11	4,90	1,70	2,32	1,06	-	-	-
12	C12	7,96	1,98	-	0,06	-	-	-
13	C13	9,8	-	-	-	-	-	-
14	C14	9,9	-	-	-	-	-	-
15	C15	10	-	-	-	-	-	-

Les catalyseurs C7 et C11 (entrée 7 et 11, Tableau 9) sont les catalyseurs qui présentent les meilleurs résultats. Ils génèrent respectivement 1,74 et 2,32 mM d'AMFC, pour seulement 1 et 0,9 mM de HMF. Les catalyseurs C11 et C7 ont converti environ 5 mM de HMFA et environ 50 % de cette conversion correspond à l'AMFC (respectivement 2,7 et 2,4 mM). De plus, malgré la conversion en produit intermédiaire (AMFA, 1,9 et 1,7 mM) avant l'obtention d'AMFC, aucun produit d'oxydation du HMF n'est détecté à 48 h dans le milieu réactionnel. Ces résultats nous indiquent que la voie d'oxydation du HMFA est prédominante par rapport à la désamination oxydative. Ces deux catalyseurs sont donc les meilleurs candidats obtenus lors de ce criblage vis-à-vis de la réaction d'oxydation du HMFA. Cependant la présence d'une voie de désamination oxydative impacte le rendement final en furfurylamine et l'efficacité du catalyseur. Pour rappel, l'introduction a défini deux voies majoritaires qui nous permettent d'accéder à l'AMFC à partir du HMF au travers de l'utilisation de catalyseurs hétérogènes d'oxydation et de transaminases. La première passe par la transamination du HMF en HMFA puis l'oxydation de ce dernier. Cependant, comme vue ci-dessus, l'étape d'oxydation du HMFA (avec les catalyseurs possédés) n'est pas sélective de la production d'AMFC (rendement maximal d'environ 27 % et désamination oxydative observée).

De ce fait, les 15 mêmes catalyseurs sont testés pour déterminer si l'un d'entre eux peut oxyder sélectivement le HMF en AFCA afin d'implémenter la seconde voie mécanistique pensée au début de ce chapitre.

3.4 Criblage de nanoparticules métalliques supportées pour l'oxydation sélective du HMF en AFCA

Au total, 15 catalyseurs métalliques hétérogènes ont été criblés sur le HMFA (Schéma 16) à petite échelle (1 mL), dans des fioles scellées en verre, afin de limiter l'évaporation.

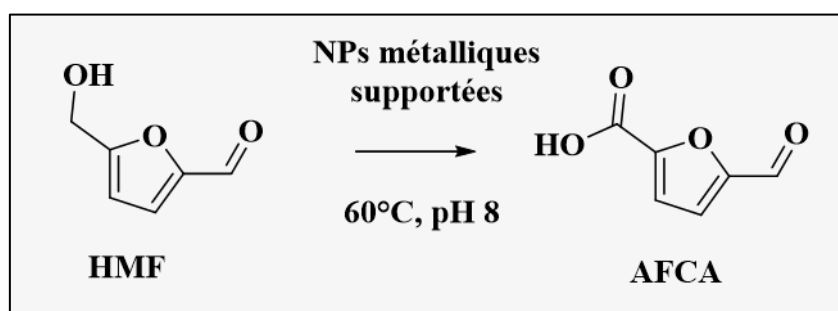


Schéma 16 : Équation bilan attendue pour l'oxydation du HMF en AFCA.

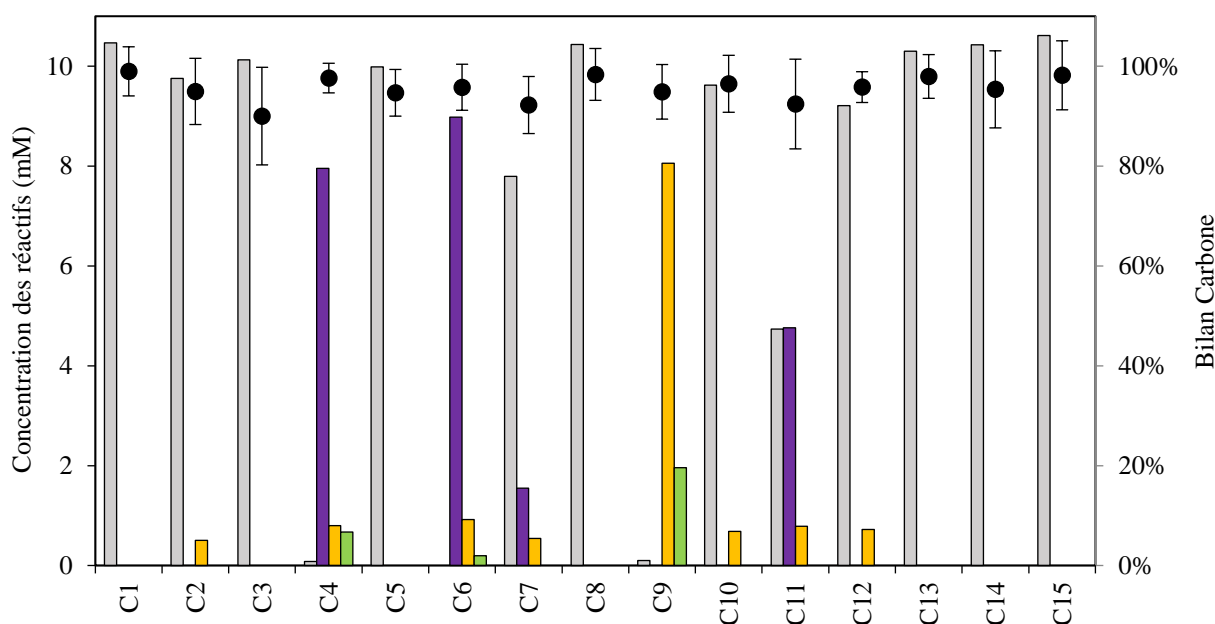


Figure 33 : Concentrations en HMF (□), HFCA (■), AFCA (■) FDCA (■) mesurées par HPLC-DAD après réaction pendant 24 h, à 60 °C avec les 15 catalyseurs oxydatifs sélectionnés.

Les résultats sont présentés en Figure 33. Les catalyseurs C1, C3, C5, C8, C13, C14 et C15 se sont révélés inactifs dans les conditions utilisées. Les catalyseurs C7 et C11 ont formé

les mêmes quantités d'AFCA, mais avec respectivement uniquement 2,2 et 5,2 mM consommés de HMF. Ces résultats indiquent que, dans les conditions proposées, les catalyseurs favorisent la conversion de l'aldéhyde en acide carboxylique. Les catalyseurs C2, C10 et C12, quant à eux, produisent sélectivement 0,5, 0,7 et 0,7 mM d'AFCA respectivement. Ces résultats suggèrent que dans le cas de ces catalyseurs, l'étape limitante est la conversion de l'aldéhyde en acide carboxylique. Cependant, ils ont été considérés comme de mauvais candidats à cause du faible taux de conversion du HMF (respectivement 0,5, 0,7 et 0,8 mM consommé). Pour les catalyseurs C4 et C6 (Au@CaO et Au@MgO) une conversion supérieure à 99 % du HMF est observée. Cependant, seulement une petite quantité d'AFCA est observée dans le milieu (respectivement 0,8 et 0,9 mM). Dans le cas de ces catalyseurs, l'oxydation de l'alcool semble être l'étape limitante. En effet, la production de HFCA est respectivement de 8 et 9 mM pour les catalyseurs Au@CaO et Au@MgO. De plus on peut remarquer que la production de FDCA semble être concomitante avec la production d'AFCA (0,8 mM d'AFCA pour 0,7 mM de FDCA pour le C4 et 0,9 pour 0,2 mM pour le C6). Ce résultat nous conforte dans l'idée que l'oxydation de la fonction alcool en aldéhyde est l'étape limitante, car une fois le composé AFCA formé, il est converti en FDCA. Ces catalyseurs n'ont donc pas été retenus à cause de leur faible capacité à oxyder la fonction alcool en aldéhyde. Le catalyseur le plus prometteur est le Pt@SiO₂ (C9), qui après 24 h d'oxydation à 60 °C mène à 8 mM d'AFCA et 2 mM de FDCA. L'absence de HFCA dans le milieu réactionnel suggère un mécanisme réactionnel similaire à celui des catalyseurs C2, C10 et C12 avec l'oxydation de l'aldéhyde en étape limitante.

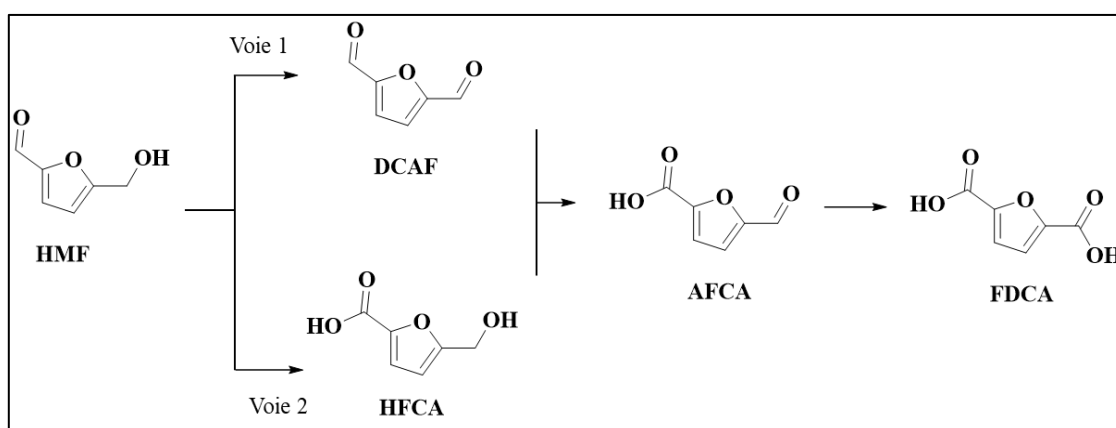


Figure 34 : Proposition des deux chemins et intermédiaires pour l'oxydation du HMF en FDCA.

Le chemin réactionnel d'oxydation passerait dans ce cas alors par un intermédiaire DCAF (Figure 34, voie 1) par opposition aux catalyseurs Au@CaO et Au@MgO qui forment d'abord le HFCA (Figure 34, voie 2). Cette hypothèse est corroborée par le fait que le DCAF

n'a pas été détecté dans aucun des milieux réactionnels, même à l'état de traces. Comme la Figure 33 présente les résultats à 24 h, nous pouvons assumer l'hypothèse que le DCAF formé à déjà été consommé pour donner de l'AFCA. Une cinétique d'oxydation avec des points intermédiaires sera nécessaire pour valider le comportement du catalyseur. Le catalyseur Pt@SiO₂ sélectionné pour la réalisation de notre première voie hybride a alors été caractérisé de manière plus complète avant son utilisation en synthèse.

3.5 Caractérisation du catalyseur Pt@SiO₂

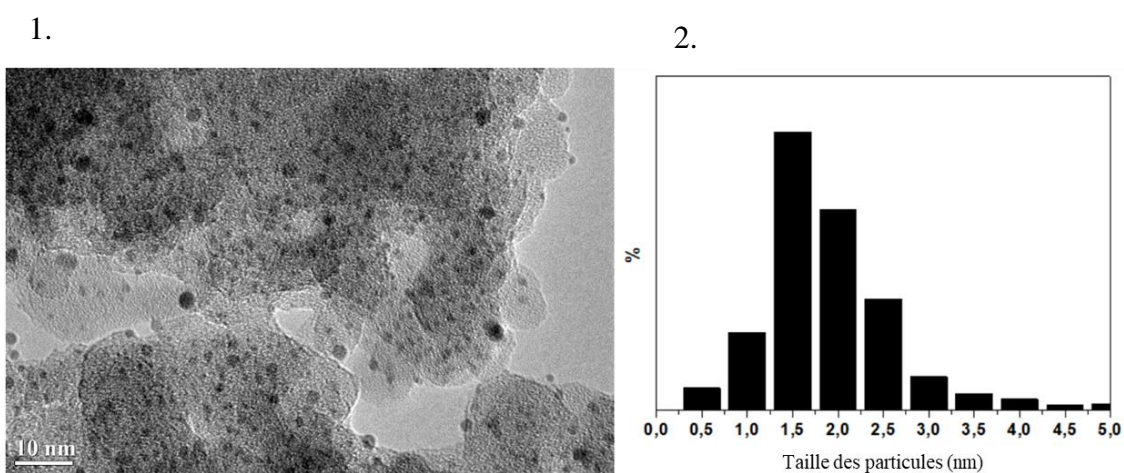


Figure 35 : Image TEM du Pt@SiO₂ et représentation graphique de la taille des nanoparticules.

Les résultats de l'analyse TEM (Figure 35.1) confirment que de très petites nanoparticules métalliques de Pt ont été obtenues (environ 1,5 nm, Figure 35.2). L'activité catalytique élevée de ce catalyseur, déterminée lors du criblage de catalyseur pour l'oxydation du HMF peut donc être expliquée. En effet, il est généralement admis que les petites nanoparticules métalliques présentent une activité catalytique améliorée grâce à la combinaison de grandes proportions d'atomes de surface à haute énergie. Il est également nécessaire d'obtenir une distribution précise des tailles. Une dispersion très élevée de nanoparticules de Pt a été obtenue même avec la charge métallique relativement élevée de 6,3 % en poids (ICP).

3.6 Confirmation du comportement du catalyseur Pt@SiO₂

Une étude de la cinétique d'oxydation du HMF lors de la première étape du procédé hybride 1P2S (que nous détaillerons par la suite) nous a permis de confirmer l'hypothèse émise sur le comportement du catalyseur Pt@SiO₂. En opposition aux catalyseurs supportés à l'or (C4 et C6, Au@CaO et Au@MgO) qui ont montré une forte quantité de HFCA produite dans le milieu, nous avons pu détecter le DCAF en proportion plus importante que celle du HFCA lors de l'utilisation du catalyseur au platine (Figure 36). 17 % de DCAF ont été détectés après 15 h de réaction dans un volume réactionnel de 10 ml à partir de 10 mM de HMF. Nous pouvons donc assumer que l'étape limitante des catalyseurs à l'or est l'oxydation de la fonction alcool en aldéhyde.

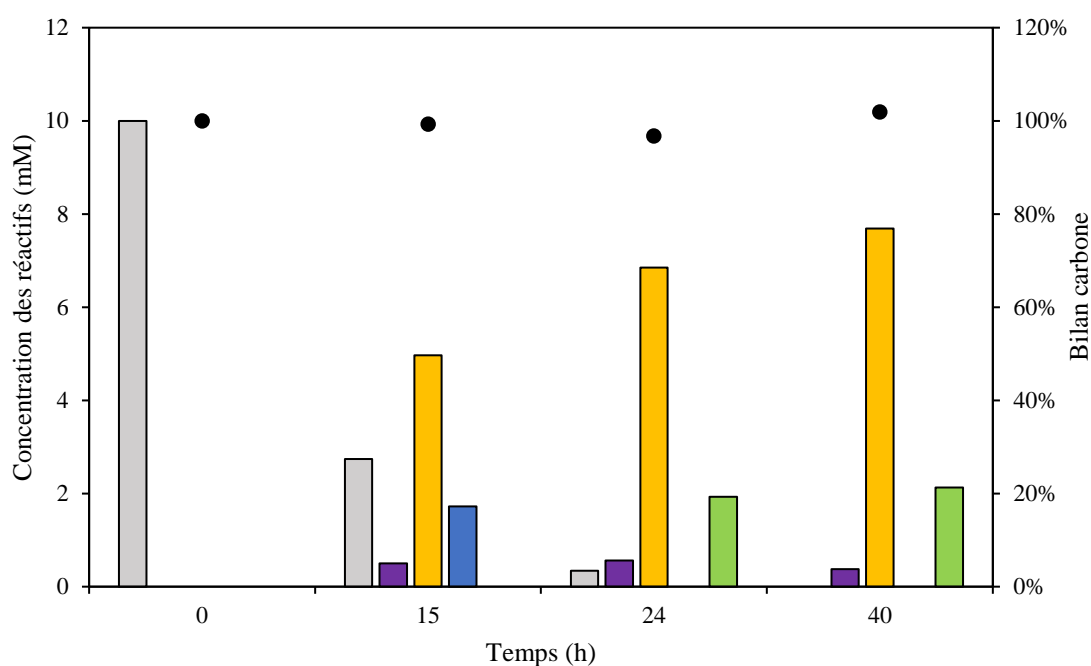


Figure 36 : Concentrations de HMF (□), HFCA (■), AFCA (■) FDCA (■) et DCAF (■) mesurées par chromatographie liquide à haute performance avec détection par barrette de diodes (HPLC-DAD) après 0, 15, 24, et 40 h. la réaction chimio-catalytique oxydative a été réalisée à 60 °C pendant 40 h dans 10 mL de tampon phosphate de sodium à pH 8, sur 10 mM de HMF et 20 mg Pt/SiO₂ (rapport substrat/métal 1/20).

A contrario, pour le platine supporté sur silice, l'oxydation de l'aldéhyde semble être l'étape limitante. Effectivement, une fois le DCAF formé celui-ci est converti en AFCA, mais la double oxydation semble être une limite, cela pourrait expliquer pourquoi la quantité de FDCA n'augmente pas drastiquement une fois que l'AFCA est formé dans le milieu réactionnel. La Figure 37 propose donc un chemin réactionnel pour la formation des composés AMFC et FDCA à partir du HMF en utilisant le Pt@SiO₂.

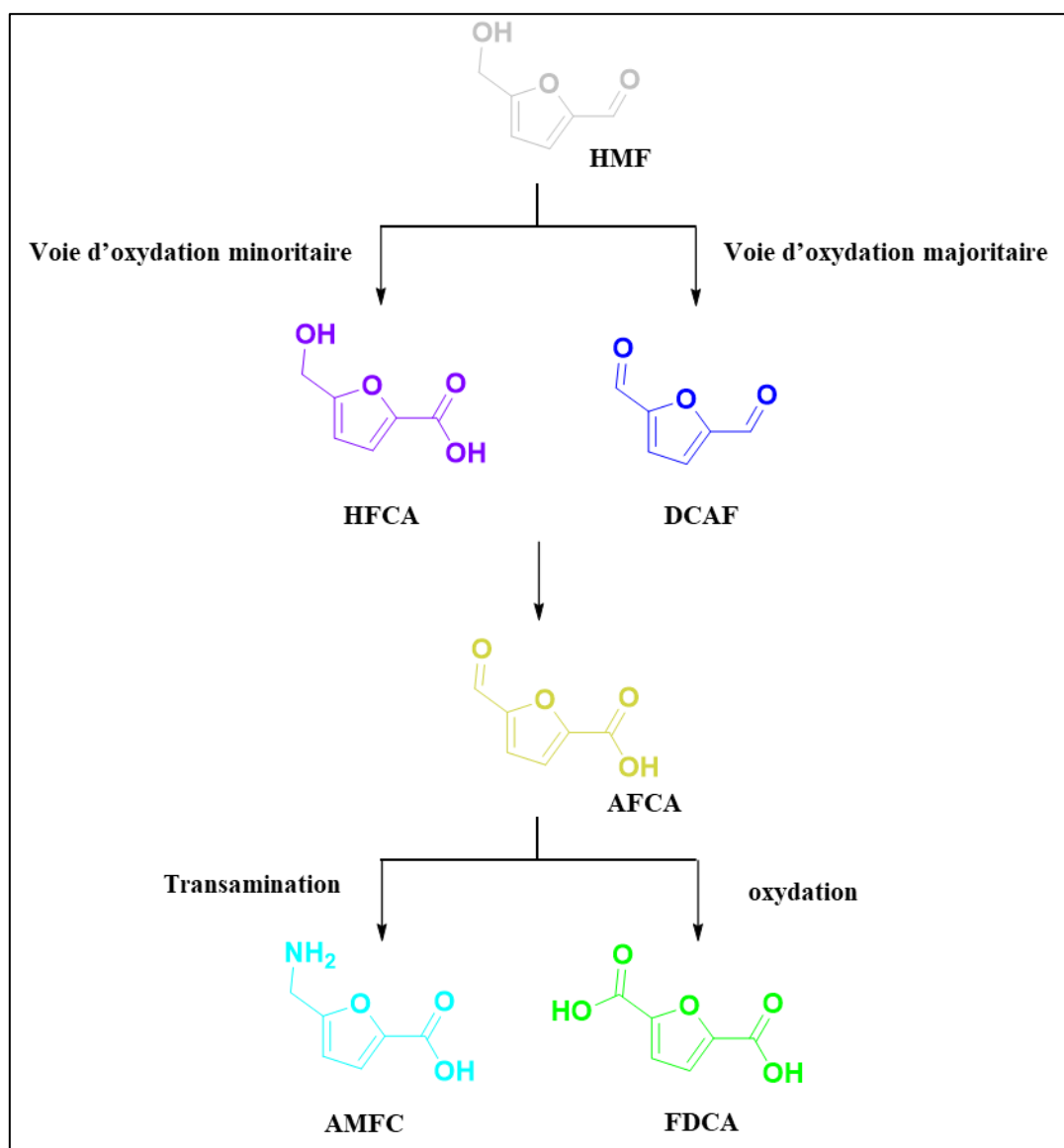


Figure 37 : Proposition de chemins réactionnels pour la formation d'AMFC et de FDCA directement à partir du HMF dans un procédé hybride 1P2S.

Lors du criblage d'oxydation du HMFA décrit précédemment dans ce chapitre de cette thèse, nous avons observé la formation indésirable de HMF et de dérivés d'oxydation, laissant supposer une réaction de désamination oxydative parallèle à l'oxydation. Nous nous sommes ainsi intéressés pour finir à comprendre un peu mieux ce phénomène, d'autant qu'à notre

connaissance, aucun travail similaire n'avait encore jamais été réalisé sur la désamination oxydative de molécules aminées à l'aide de catalyseurs chimiques hétérogènes. De plus cela nous permettra de valider le chemin réactionnel sélectionné et confirmer ainsi le comportement du catalyseur sur le HMFA.

Pour réaliser ces observations, nous nous sommes focalisés sur le Pt@SiO₂, qui avait été utilisé et sélectionné pour mettre en œuvre un procédé 1P2S pour la production d'AMFC. Le Schéma 17 représente ainsi le schéma réactionnel test que nous avons mis en place pour étudier la réaction de désamination oxydative du HMFA.

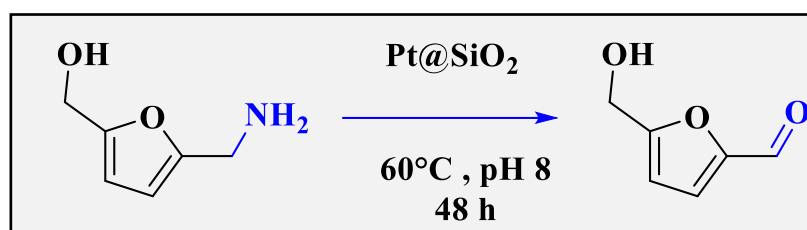


Schéma 17 : Schéma réactionnel de la réaction de désamination oxydative sur le HMF par le catalyseur Pt@SiO₂.

Par rapport au criblage effectué, un point intermédiaire à 24 h est effectué pour essayer de déterminer par quelle intermédiaire passe cette réaction. Le Tableau 10 présente les concentrations mesurées à 24 et 48h par HPLC-DAD.

Tableau 10 : Concentrations des produits réactionnels mesurées par HPLC-DAD à t₀, 24 et 48 h lors de la réaction de désamination oxydative du HMFA par le catalyseur Pt@SiO₂.

Temps (h)	Concentrations des réactifs (mM)						Bilan carbone
	HMFA	HMF	AMFA	AFCA	DCAF	AMFC	
0	10	0	0	0	0	0	100
24	6,74	0,96	0,76	0,81	0,59	0,12	99,8
48	4	1,66	1,79	1,39	0,93	0,22	99,9

A la vue de ces résultats, on constate une nette augmentation de la concentration en HMF, et en ses dérivés oxydés, en parallèle de la consommation d'HMFA et de la production d'AMFA et d'AMFC. En fait, après 24 h de réaction 73 % des composés formés à partir du HMFA sont des dérivés issus de la désamination de celui-ci. Après 48 h, cette tendance apparaît moins

prononcée, avec 66 % des composés formés à partir du HMFA, même si ce pourcentage demeure tout de même très important. Ainsi afin de pouvoir déterminer un potentiel mécanisme des études supplémentaires à différents pH seraient nécessaires pour voir si ce paramètre aurait une influence sur la formation des composés.

4 Conclusion

En conclusion, ce chapitre avait pour objectif de déterminer quelle voie réactionnelle emprunter pour le développement d'un procédé hybride pour la production d'AMFC directement à partir de HMF. Nous avons donc dans un premier temps vérifié la capacité de la transaminase de *Chromobacterium Violaceum* (Cv-TA, Q7NWX4) à convertir le HMF et ses dérivés d'oxydations en leurs équivalents aminés. Une fois cela vérifié nous nous sommes attelés à tester les capacités d'oxydations de 15 catalyseurs chimiques sur le HMFA et le HMF. Le criblage de catalyseurs sur l'oxydation du HMFA s'est montré peu optimal. Le meilleur catalyseur (C4, Au@CaO) a montré une sélectivité de 27 % pour l'AMFC en 48 h de réaction. Cependant, une réaction parasite a été identifiée dans ce sens réactionnel. Il s'agit d'une désamination oxydative (réalisée par plusieurs catalyseurs), convertissant l'HMFA en HMF, et réduisant d'autant les rendements en furfurylamines.

Le criblage d'oxydation du HMF nous a permis d'identifier un catalyseur de platine supportée sur silice (C11) qui est sélectif de l'AFCA (80 % en 24 h) dans nos conditions de réactions (60 °C, milieu aqueux tamponné). La voie réactionnelle n° 2 définie dans l'introduction s'avère donc plus prometteuse pour aboutir à la formation d'une quantité maximale d'AMFC, la molécule que nous ciblons en priorité dans ce travail. Ce faisant, la prochaine étape de cette thèse s'est trouvée être la mise au point d'un premier procédé hybride 1P2S avec en premier lieu l'oxydation sélective du HMF en AFCA, puis la transamination de ce dernier en AMFC par la Q7NWX4.

Chapitre 2 : Développement d'un procédé hybride « one-pot/two-steps » pour la formation d'acide 5-amino 2-furanoïque (AMFC) à partir du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF)

1 Validation de la preuve de concept

Suite aux précédents criblages, je me suis attelé à la mise en œuvre du procédé hybride en mode 1P2S passant par la formation d'AFCA comme intermédiaire. La stratégie était alors de réaliser en premier lieu la réaction d'oxydation chimique du HMF en AFCA avec le Pt@SiO₂, à 60 °C, puis une fois la quantité en ce dernier maximale, de stopper la réaction d'oxydation en laissant refroidir le milieu afin d'y ajouter dans un second temps le donneur d'amine ((*S*)-MBA) et la transaminase (Q7NWX4). Cette réaction a ainsi été menée sur 10 mM de HMF, et un rapport en (*S*)-MBA/AFCA de 1/1 (mol) a ensuite été utilisé (Schéma 18).

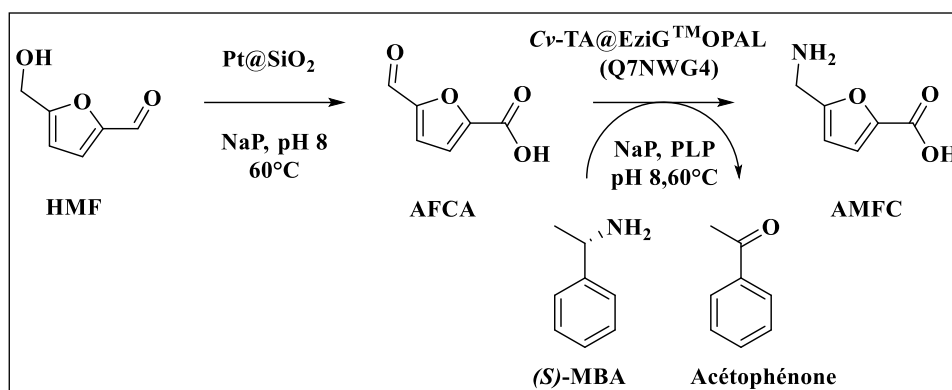


Schéma 18 : Catalyse hybride « one-pot/two-steps » appliquée à la conversion du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) en acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC), combinant le catalyseur hétérogène Pt/SiO₂ et la transaminase *Chromobacterium violaceum* (Cv-TA) immobilisée sur EziG™OPAL.

Cette preuve de concept a été effectuée sur un réacteur de 1 ml (disponible en annexes B, Figure 90). Afin d'étudier plus précisément la cinétique de réaction et son fonctionnement, une mise en échelle du procédé 1P2S est effectuée dans un réacteur de 10 ml.

2 Développement et optimisation d'un procédé hybride 1P2S

La réaction a alors été réalisée dans un volume final de 10 ml pour pouvoir effectuer une purification des produits désirés, mais tout en gardant un volume gazeux identique aux criblages précédents. Lors de ce premier test, la conversion complète du HMF n'a cependant été observée qu'après 48 h (malgré le fait que le volume de la phase gazeuse était proportionnellement identique à celui utilisé lors de l'étape de criblage des catalyseurs chimiques). La concentration du composé intermédiaire (HFCA) a atteint une valeur maximale de 0,9 mM (9 %) après 24 h de réaction jusqu'à de nouveau disparaître après 64 h. Tandis que lors du criblage d'oxydation, à 24 h de réaction le milieu réactionnel comprenait déjà 80 % d'AFCA et 20 % de FDCA. Une hypothèse qui peut expliquer la différence de cinétique est la mise en œuvre du procédé en lui-même. L'utilisation de l'étuve comme système de chauffage n'est peut-être pas adaptée à un réacteur plus important. Le volume de milieu réactionnel n'est peut-être pas chauffé de manière uniforme. Ainsi, l'activité catalytique est moins élevée et par conséquent la cinétique d'oxydation est moins rapide, laissant apparaître plus d'intermédiaires.

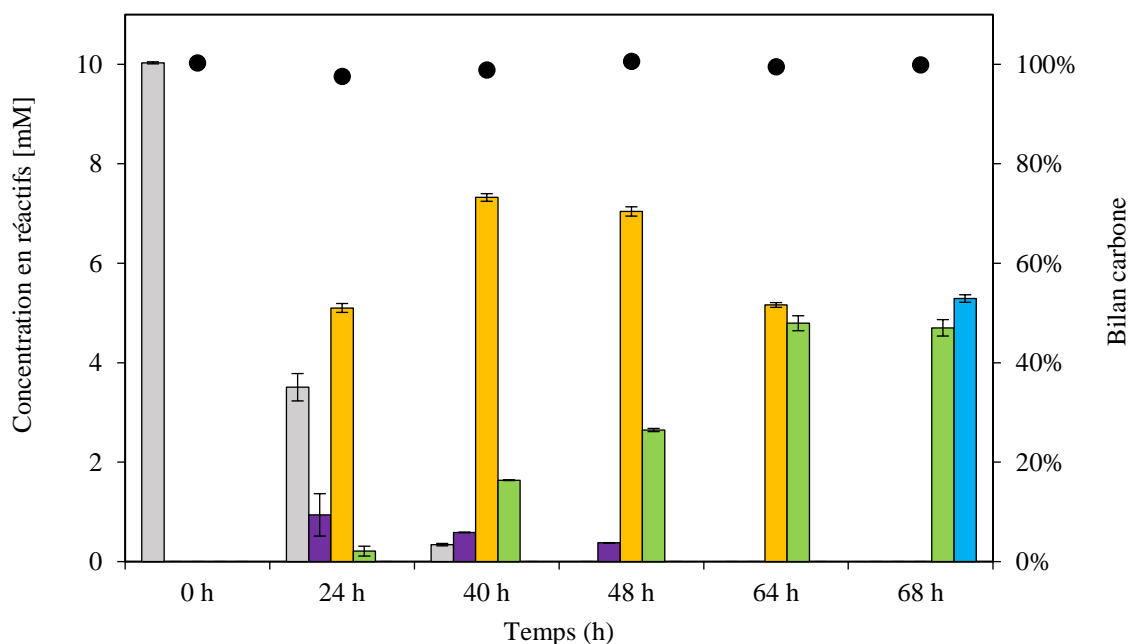


Figure 38 : Concentrations de HMF (□), HFCA (■), AFCA (■) FDCA (■) et AMFC (■) mesurées par chromatographie liquide à haute performance avec détection par barrette de diodes (HPLC-DAD) après 0, 24, 40, 48, 64 et 68 h. La première étape chimio-catalytique oxydative a été réalisée à 60 °C pendant 64 h dans 10 mL de tampon phosphate de sodium à pH 8, sur 10 mM de HMF et 20 mg Pt/SiO₂ (rapport substrat/métal 1/20). La seconde étape de transfert d'amine a été réalisée à température ambiante pendant 4 h avec 10 mg de Cv-TA immobilisée sur 30 mg de support EziGTMOPAL.

Ainsi, après 64 h de réaction, seuls l'AFCA et le FDCA ont pu être observés, avec une concentration de 5,2 mM et 4,8 mM respectivement, ce qui est bien inférieur (dans le cas de l'AFCA) au rendement obtenu lors des criblages. Malgré cela, l'étape de transamination a été initiée. Après 4 h à température ambiante, la conversion complète de l'AFCA en AMFC a pu être observée. Cette première tentative nous a donc permis d'obtenir un premier rendement prometteur de 53 % en AMFC. Une fois purifié sur une colonne échangeuse de cation (DOWEX 50W X8), j'ai pu récupérer 50 % en AMFC.

Bien que seul du FDCA ait été observé comme co-produit à la fin de cette première tentative, et que, comme nous l'avons observé, celui-ci est également un produit valorisable, nous avons cherché à améliorer le rendement en AMFC du système en 1P2S en réalisant une seconde tentative. Pour cela nous avons choisi d'effectuer l'étape de transamination plus tôt. En étudiant la cinétique d'oxydation, nous avons constaté que la quantité d'AFCA commence à diminuer à partir de 40 h où elle atteint son maximum (73 %, Figure 38). Nous avons donc choisi pour ma seconde tentative de réaliser l'étape de transamination après 40 h (Figure 39). Cette fois, à 40 h la concentration en AFCA était de 7,7 mM (77 %), avec une très faible concentration résiduelle en HFCA (0.37 mM, 4%). De la même manière que précédemment, une conversion complète de l'AFCA en AMFC a pu être observée après l'ajout de la transaminase et du donneur d'amine, avec un rendement final de 77 % en AMFC. De cette manière, nous avons bien réussi à maintenir une concentration en FDCA plus faible avec un rendement de 21 % contre 45 % lors de la première tentative, montrant une nette amélioration du procédé hybride comme escompté.

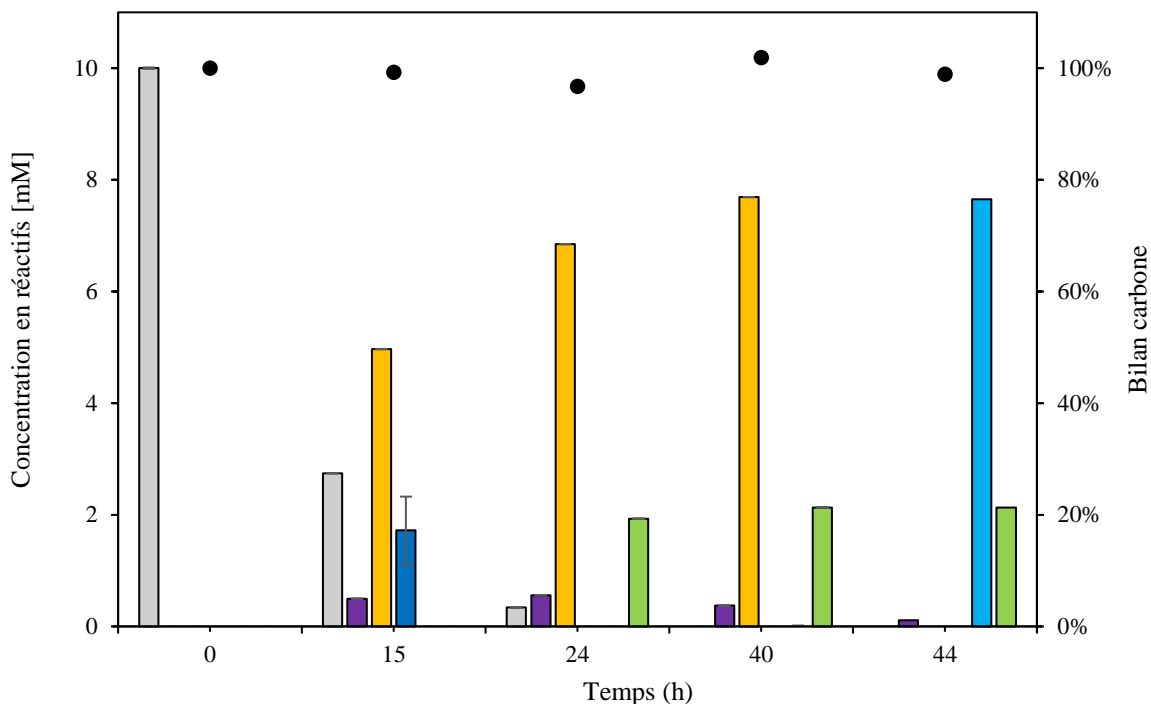


Figure 39 : Concentrations de HMF (■), HFCA (■), AFCA (■) FDCA (■), DCAF (■) et AMFC (■) mesurées par chromatographie liquide à haute performance avec détection par barrette de diodes (HPLC-DAD) après 0, 15, 24, 40 et 44 h. La première étape chimio-catalytique oxydative a été réalisée à 60 °C pendant 40 h dans 10 mL de tampon phosphate de sodium à pH 8, sur 10 mM de HMF et 20 mg Pt/SiO₂ (rapport substrat/métal 1/20). La seconde étape de transfert d'amine a été réalisée à température ambiante pendant 4 h avec 10 mg de Cv-TA immobilisée sur 30 mg de support EziGTMOPAL.

Notons que l'étape de transamination ayant été réalisée plus tôt, une petite quantité de HFCA a également été maintenue après l'étape de transamination, même si celle-ci s'est révélée anecdotique (1,5 %). Cette impureté a d'ailleurs pu facilement être séparée des deux produits principaux pendant l'étape de purification, et un rendement final de 67 % et 20 % ont pu être obtenus pour l'AMFC et le FDCA, respectivement.

Afin de pousser un peu plus loin l'optimisation de ce premier procédé hybride pour la production de l'AMFC, l'influence de la présence de l'IPA comme donneur d'amine à la place de la MBA a été étudiée. L'IPA est en effet un donneur d'amine plus prometteur dans le cadre de la mise en œuvre de procédés de chimie verte, car son nombre d'atomes est minimal, comparé à la MBA notamment. Dans le cadre de la synthèse de petites molécules comme l'AMFC, ce nombre d'atome est d'autant plus important puisqu'il serait dommageable de produire une molécule qui comporte 6 carbones à partir d'une qui en contient 8 comme la MBA. Ce faisant, nous avons réalisé une troisième tentative en utilisant cette fois un rapport

IPA/AFCA de 10/1 (mol) lors de l'étape de transamination après 40 h. La cinétique de cette réaction est présentée dans la Figure 40.

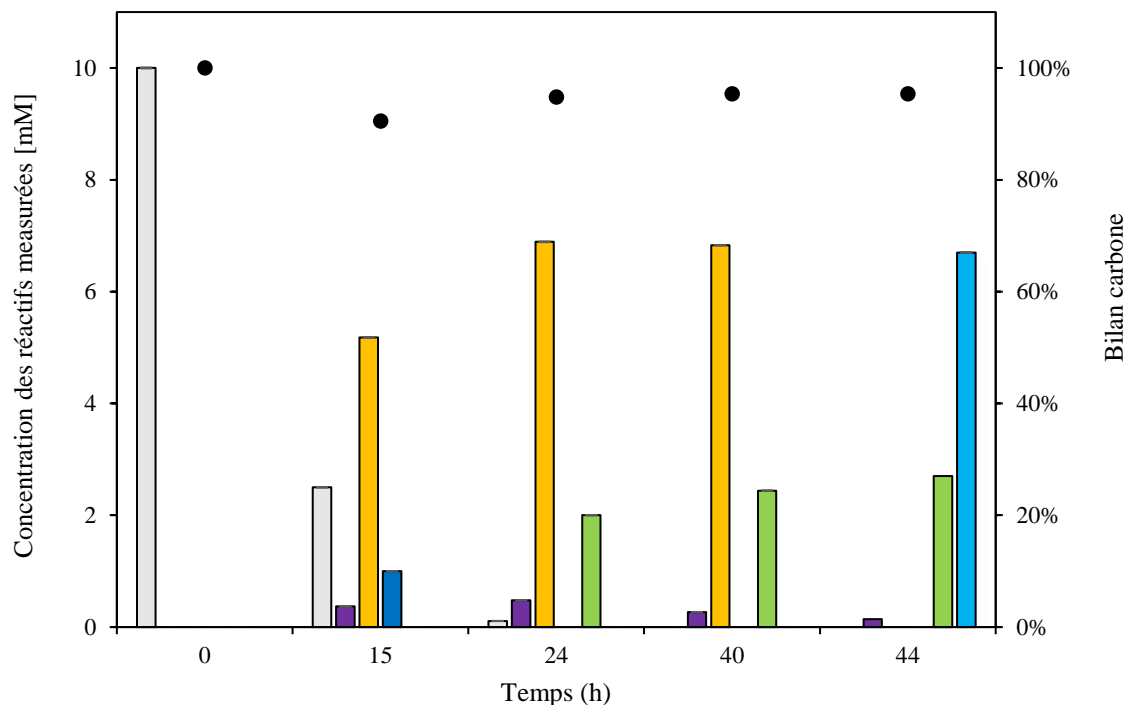


Figure 40 : Concentrations de HMF (□), HFCA (■), AFCA (■) FDCA (■), DCAF (■) et AMFC (■) mesurées par chromatographie liquide à haute performance avec détection par barrette de diodes (HPLC-DAD) après 0, 15, 24, 40 et 44 h. La première étape chimio-catalytique oxydative a été réalisée à 60 °C pendant 40 h dans 10 mL de tampon phosphate de sodium à pH 8, sur 10 mM de HMF et 20 mg Pt/SiO₂ (rapport substrat/métal 1/20). La seconde étape de transfert d'amine a été réalisée à température ambiante pendant 4 h avec 10 mg de Cv-TA immobilisée sur 30 mg de support EziG™OPAL.

Un profil similaire en réactifs et produits a été observé à chaque temps de réaction, même si la concentration de FDCA s'est avérée légèrement plus élevée après 40 h, avec 2,4 mM (24 %). Finalement, 6,7 mM d'AMFC (67 %) et 2,7 mM de FDCA (27 %) ont tout de même pu être obtenus avec ce donneur d'amine. De la même manière que précédemment, seulement 1 % de HFCA a été détecté à la fin du procédé hybride. Après purification, des rendements de 57 % en AMFC et 20 % en FDCA ont pu être récupérés.

Ainsi, avec une consommation complète de HMF en 48 h, et 77 % de rendement en AMFC dans le meilleur des cas, ce résultat représente le premier développement d'une catalyse hybride 1P2S jamais décrite pour la synthèse ce synthon directement à partir du HMF. Ajoutons

que ce procédé fonctionne de manière équivalente avec la MBA et l'IPA comme donneur. Si l'on compare aux résultats de la littérature, on pourra également noter que le rendement est ici substantiellement supérieur à celui décrit par *Dunbabin et al.* (47 %) alors qu'ils ont également utilisé la (*S*)-MBA et la *C_v*-TA, mais en partant de l'AFCA directement. Notons également que les procédés en synthèse organique plus conventionnelle développés jusque-là n'ont permis d'atteindre que 60 %. À cela il convient de rajouter que notre procédé est effectué en milieu aqueux, et n'utilisent pas de réactifs coûteux et toxiques. Pour finir, bien qu'il n'ait pas été développé dans cet objectif, notre procédé hybride a permis de synthétiser et du FDCA en concentration importante, et de l'obtenir sous forme pure après une simple purification sur résine échangeuse d'ions. Ces résultats très prometteurs ont donc naturellement fait l'objet d'une première publication dans *ChemCatChem* en Janvier 2021, qui est adjointe à la fin de ce manuscrit ¹⁹⁰. Nous avons même eu l'honneur de faire une couverture présentée en Figure 41.

Une fois cette première étape accomplie, nous nous sommes donc tout naturellement tournés vers la mise en œuvre d'un procédé hybride 1P1S qui permettrait un accès direct à l'AMFC. Pour cela, le présent chapitre a permis de mettre en évidence certains verrous à lever pour la mise au point de cette réaction. Premièrement, l'utilisation d'une transaminase thermostable sera essentielle pour la mise au point d'un tel procédé. Effectivement, les NPs métalliques supportées n'ont montré aucune activité à 30 °C, il faut donc effectuer ce procédé à une température minimale de 50 °C. Dans un second temps, il faut trouver des NPs métalliques supportées qui peuvent agir sur le composé HMFA et qui ne favorisent pas la réaction de désamination oxydative dans la mesure où cet intermédiaire sera obligatoirement présent dans le milieu si la transaminase est ajoutée dès le début de la réaction.

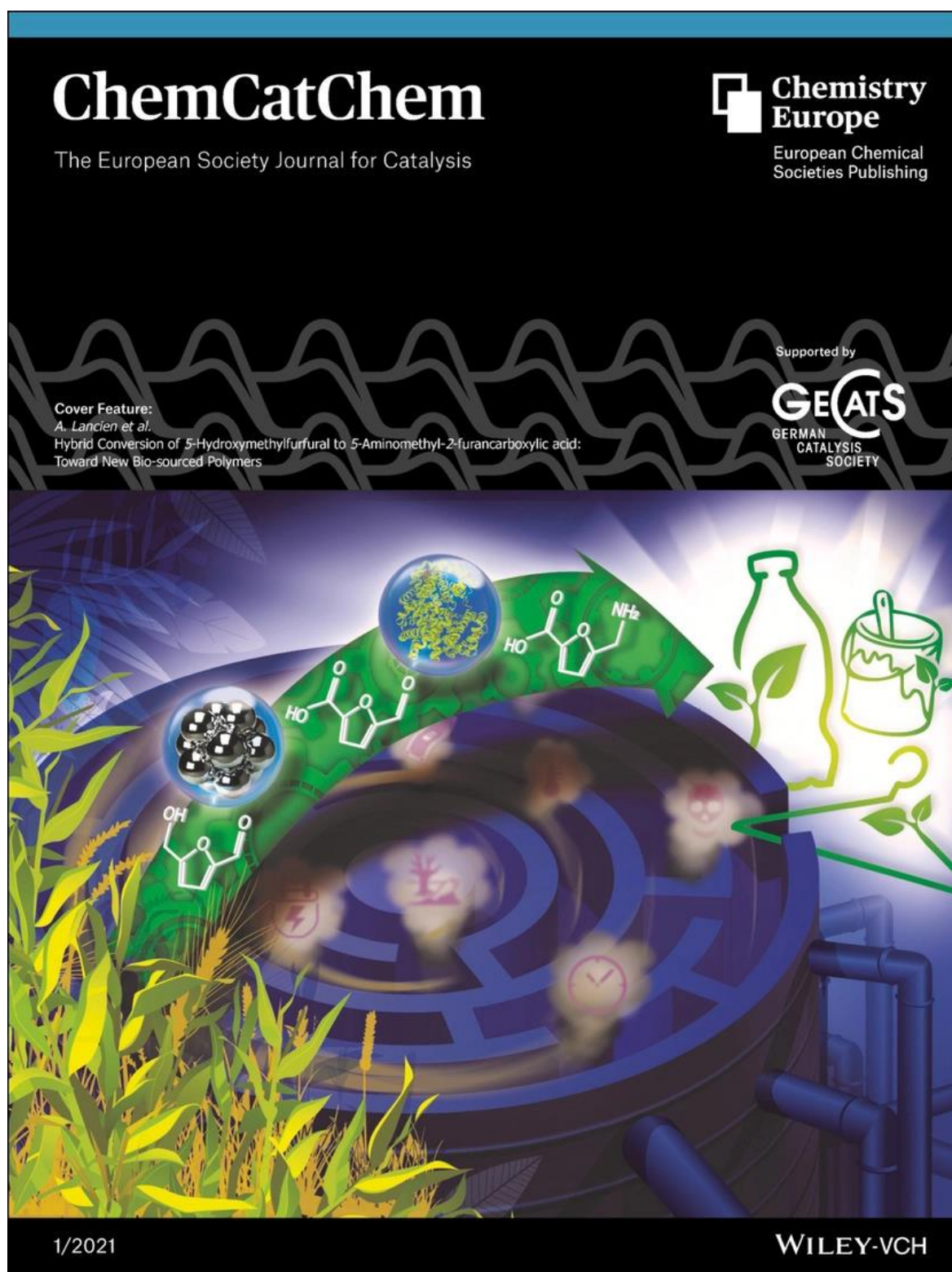


Figure 41 : Couverture du ChemCatChem pour la valorisation du procédé hybride 1P2S sur la conversion du HMF en AMFC.

Chapitre 3 : Sélection et caractérisation des catalyseurs chimique et enzymatique pour le développement du procédé hybride « one-pot/one-step »

1 Introduction

Le chapitre précédent s'est conclu par le développement d'un procédé hybride de type 1P2S combinant des nanoparticules de platines supportés sur de la silice et une transaminase (*Cv*-TA, Uniprot Access Number : Q7NWX4) immobilisée sur un support EziG™@OPAL. Suite à cela nous nous sommes donc tournés vers la mise au point d'un procédé en 1P1S.¹² Afin d'aboutir à ce procédé, certains verrous identifiés dans le chapitre 1 ont été pris en compte. Premièrement, la *Cv*-TA a montré une instabilité thermique à 60 °C, même si une conversion de 37 % de l'HMF en HMFA a été obtenue en 10 min, mais avec une totale inactivation de l'enzyme après ce temps de réaction. Il fallait donc trouver une transaminase thermostable afin de pallier ce premier verrou. Ainsi, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du professeur Uwe Bornscheuer de l'université de Greifswald (Allemagne), nous avons étudié la thermostabilité de 5 transaminases que son groupe nous a fait parvenir. Le second objectif fut de trouver un catalyseur chimique sélectif du HMFA et qui ne réalise pas de désamination oxydative (voir chapitre 1). Cependant, si un catalyseur parvenait à être trouvé pour l'oxydation du HMFA en AMFC, le développement d'un procédé 1P1S implique que le HMF puisse être converti à la fois par la transaminase pour former l'HMFA (Figure 42), et par les NPs métalliques supportées pour former les produits DCAF, HFCA, AFCA et FDCA (Figure 42). L'idéal serait donc de trouver un catalyseur chimique à la fois actif sur le HMFA et le HMF et une transaminase active sur tous les dérivés d'oxydation possédant une fonction aldéhyde. Dans le cas contraire, il faudrait jouer sur la cinétique des deux catalyseurs en présence pour limiter la formation de certains des intermédiaires.

Or de manière intéressante, nous avons constaté que la transformation du HMF en HMFA par la transaminase est beaucoup plus rapide (en heures) que la conversion du HMF en dérivés oxydés par les catalyseurs chimiques testés jusque-là (en jours). De plus, le fait d'adapter les conditions de fonctionnement du catalyseur chimique à celles de l'enzyme nous permet d'émettre l'hypothèse que la cinétique de transamination sera toujours efficace vers la formation des furfurylamines. Ainsi, en cas de difficulté, il nous serait possible de favoriser la réaction de transamination afin de produire du HMFA en grande majorité, rendant la recherche d'un catalyseur chimique sélectif du HMFA prioritaire sur sa capacité à oxyder les autres composés.

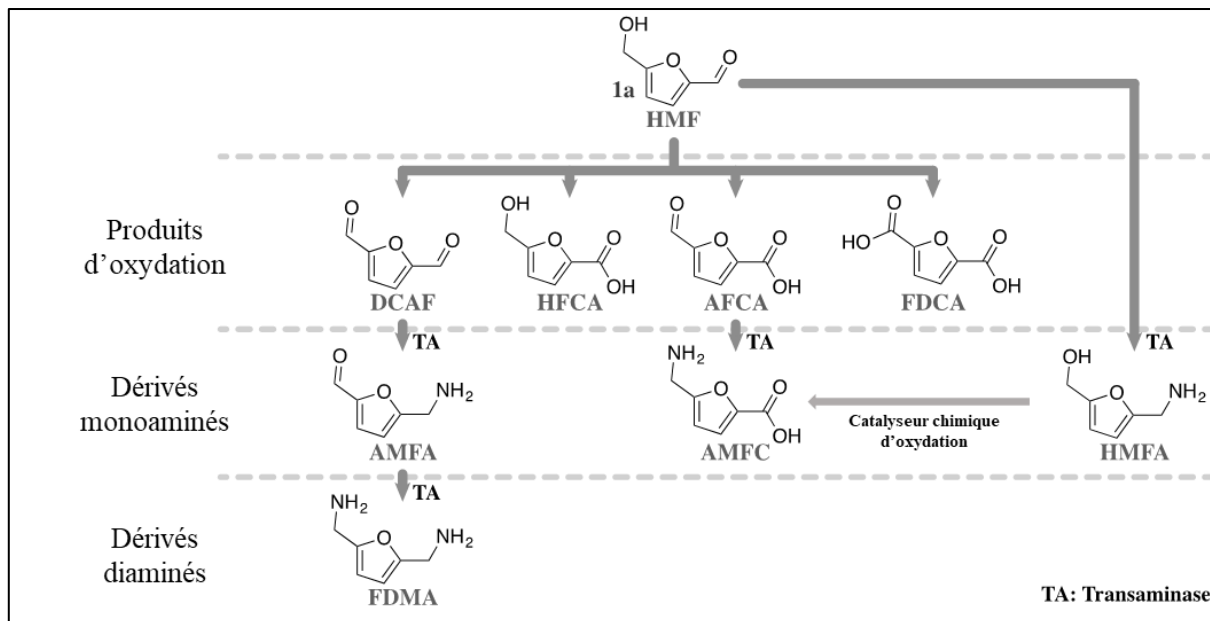


Figure 42 : Structure des produits potentiels obtenus lors de la mise en œuvre du procédé hybride 1P1S combinant des nanoparticules métalliques supportées et une transaminase à partir du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF). Produit d'oxydation : 2,5-dicarboxaldéhydefurane (DCAF), acide 5-hydroxyméthyl-2-furancarboxylique (HFCA), 5-aldéhyde-2-furancarboxylique (AFCA) et acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA). Dérivés monoaminés 5-aminométhyle-2-furancarboxaldéhyde (AMFA), 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) et 5-hydroxyméthylfurfurylamine (HMFA). Dérivés diaminés : diaminométhylfurane (FDMA).

Cette partie s'articulera donc autour de deux chapitres, premièrement, la production et la caractérisation de nouvelles transaminases incluant l'étude de leur activité et stabilité thermique, ainsi que leurs pH optimaux. Dans un deuxième temps, nous étudierons la synthèse et le criblage d'un panel de nouveaux catalyseurs pour la conversion du HMFA en furfurylamine.

2 Production de nouvelles transaminases potentiellement thermostables.

Les plasmides contenant les gènes des 5 transaminases présumées thermostables (décrits dans le Tableau 11) ont été reçus de l'équipe du Prof. Bornscheuer (**Biotechnology and Enzyme Catalysis**) faisant partie de l'université de Greifswald (Allemagne). Le gène de la B9AZ94 de *Burkholderia multivorans* (*Bm*-TA) a été reçu cloner dans un plasmide pET24b. Les quatre autres gènes codant pour les enzymes I2IXB4 de *Burkholderia sp* (*Bsp*-TA), D1C7Z3 de *Sphaerobacter thermophilus* (*St*-TA), A0KE01 de *Burkholderia sp* (*Bu*-TA) et 3HMU de *Ruegeria pomeroyi* (*Rp*-TA) ont été reçu clonés dans un plasmide pET22a.

Tableau 11 : Description des différentes enzymes.

UniProt acc. num.	Nom	Gène	Organisme d'origine	Masse (Da)
B9AZ94	Aminotransferase, class III superfamily	BURMUCGD1_40 17	<i>Burkholderia multivorans</i> CGD1	48831
I2IXB4	Adenosylmethionin e-8-amino-7-oxononoate aminotransferase	BCh11DRAFT_03 18	<i>Burkholderia sp.</i> Ch1-1	50616
D1C7Z3	Aminotransferase class-III	Sthe_2449	<i>Sphaerobacter thermophilus</i>	49764
A0KE01	Aminotransferase	Bcen_6450	<i>Burkholderia sp.</i>	49157
Q5LMU1	Aminotransferase, class III	SPO3471	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	50 686

Afin de tester la production de ces enzymes, nous avons commencé par utiliser les conditions classiques de production de la Q7NWX4 (milieu LB). Le gel d'électrophorèse sur agarose effectué sur les lysats cellulaires de cette production est présenté en Figure 43.

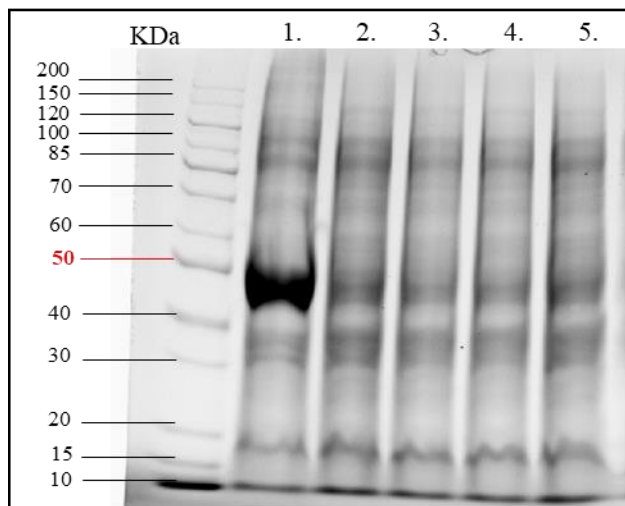


Figure 43 : Gels d'électrophorèse réalisés sur les lysats cellulaires après la lyse cellulaire (French Press, 2.4 bars, 1. B9AZ94 2. I2IXB4 3. D1C7Z3 4. A0KE01 5. 3HMU)

On y observe une bande qui saturé aux alentours de 50 kDa pour la B9AZ94, mais uniquement des bandes de très faibles intensités pour les quatre autres enzymes, ce qui laisse présager uniquement la production de la *Bm*-TA. Afin de vérifier la production des TA, et de confirmer ou d'infirmer ces suppositions, trois tests enzymatiques sont effectués. Les activités enzymatiques sont récapitulées dans le Tableau 12. Les tests avec la L-alanine et la (*S*)-MBA sont similaires à ceux décrits dans le chapitre 1. Le test avec l'isopropylamine (IPA) permet quant à lui de directement suivre la disparition du HMF à 280 nm et est donc un test plus direct que les deux autres. Son principe est récapitulé dans le Schéma 19.

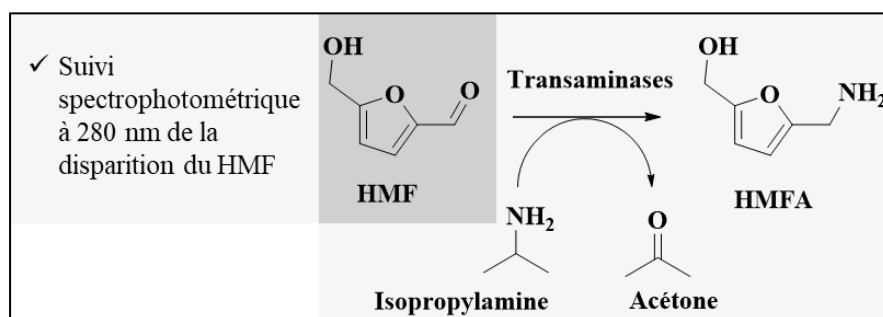


Schéma 19 : Récapitulatif du test enzymatique avec l'isopropylamine (IPA). Suivi de la disparition du HMF à 280 nm.

Tableau 12 : Quantité de protéines totales et activités ($\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$) obtenues sur les lysats cellulaires (production en LB) des 5 transaminases.

			<i>Donneur d'amine</i>			
			<i>L-alanine</i>	<i>(S)-MBA</i>	<i>IPA</i>	
			<i>Activités ($\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines totales)</i>			
			<i>Accepteur</i>			
Entrée	Enzymes	Protéines $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	<i>HMF</i>	<i>Pyruvate</i>	<i>HMF</i>	<i>HMF</i>
1	B9AZ94	8,32	118,27	50,07	8,38	8,96
2	I2IXB4	5,96	34,03	-	-	-
3	D1C7Z3	6,62	29,54	-	-	-
4	A0KE01	6,53	28,66	-	-	-
5	3HMU	6,93	34,33	-	-	-

Rappelons pour commencer que la L-alanine est considérée comme un donneur universel des (*S*)-amine-TA, et est donc en théorie un témoin positif de l'activité des enzymes. Dans le cas de ce premier test, une très nette différence d'activité a été observée entre la B9AZ94 (entrée 1, Tableau 12 : $118,27 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines totales) et les 4 autres enzymes (comprise entre 28 et $34 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines totales (entrées 2 à 5, Tableau 12)). Ce faisant, soit le HMF n'est pas substrat de ces dernières, soit, celle-ci n'ont pas été produites, et l'activité détectée provient en fait de l'activité résiduelle des amine-TA de *E. coli*. La seconde hypothèse semble se confirmer avec le test utilisant la (*S*)-MBA et le pyruvate, dans la mesure où aucune activité n'a été observée pour les enzymes autres que la B9AZ94, alors que l'équipe du Prof. Bornscheuer nous a pourtant confirmé le fait que ces enzymes sont censés accepter ce donneur. Aussi, associés au fait qu'aucune bande intense ne soit observée sur le gel (Figure 43), nous avons pu déceimment conclure qu'aucune de ces 4 enzymes n'avait été produite, et que la pente résiduelle observée avec le test à l'alanine était due aux transaminases constitutives de *E. coli*.

Concernant la *Bm*-TA, une activité d'environ $8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (entrée 1, Tableau 12) a été trouvé pour les tests utilisant la (*S*)-MBA et l'IPA comme donneurs et le HMF comme accepteur. Cette activité en utilisant directement le lysat cellulaire nous indique que la B9AZ94

accepte bien le HMF et que la mise en œuvre du procédé hybride sera possible après vérification des différents paramètres (température, pH, immobilisation). Cependant afin de pouvoir caractériser complètement cette enzyme, il apparaît nécessaire de la purifier afin que les enzymes constitutives de *E. coli* ne faussent pas les données.

Afin de voir si nous pouvions tout de même produire les 4 enzymes restantes, nous avons ensuite choisi de retenter une série de productions en faisant varier divers paramètres pouvant influencer fortement cette dernière, comme la composition du milieu, la température d'incubation, ou la quantité d'IPTG utilisé pour induire l'expression des protéines. Une première nouvelle production a donc été réalisée dans un milieu Terrific-Broth (24 g.L⁻¹ d'extrait de levures, 20 g.L⁻¹ de Trypton et 5,04 g.L⁻¹ de glycérol). La présence d'environ 5 fois plus d'extraits de levure devait favoriser une croissance d'*E. coli*. Nous avons également abaissé la température de la phase d'induction avec une valeur comprise entre 20 °C et 25 °C, qui était plus en accord avec les conditions fournies par le laboratoire partenaire de Greiswald. Une température d'induction trop importante aurait pu amener à une non-production des enzymes. Afin de vérifier les différentes étapes de production durant ce nouvel essai et d'infirmier la présence des enzymes I2IXB4, D1C7Z3, A0KE01 et 3HMU, trois prélèvements ont été réalisés au cours de la production. Un premier a été prélevé juste avant l'induction, un second juste avant l'étape de FP avant de vérifier la présence des enzymes dans les cellules, le troisième étant l'analyse du culot récupéré après lyse. Ce dernier prélèvement a en effet été réalisé afin de vérifier que les enzymes ne précipitent pas avec les débris cellulaires. A chaque fois, la production de B9AZ94 effectuée en parallèle a été utilisée comme témoin positif.

En résultats, l'absence de bandes dans le prélèvement après induction (Figure 44.A) confirme que les 4 enzymes ciblées ne sont toujours pas produites dans ces nouvelles conditions. La présence d'une bande épaisse pour la B9AZ94 nous indique que la production a pourtant bien fonctionné. Sans surprise, aucune bande n'était également révélée dans les prélèvements avant induction (Figure 44.B), y compris pour la B9AZ94. La Figure 44.C présente les gels d'électrophorèse du lysat cellulaire. Comparées à la production précédente, des bandes légèrement plus épaisses sont visibles aux alentours de 50 kDa, mais qui restent là encore trop faibles pour confirmer la présence des protéines dans le cas des 4 autres enzymes. En revanche dans la Figure 44. D, qui représente le gel d'électrophorèse des débris cellulaires, une large bande peut être observée pour la B9AZ94, mais aussi I2IXB4. Ceci peut d'une part laisser supposer qu'une grande partie de la B9AZ94 se retrouve dans les débris cellulaires, soit à cause d'une mauvaise lyse, soit parce qu'elle précipite lors de cette dernière étape. Mais cela

permet aussi de supposer que la I2IXB4 a bel et bien été produite en faible quantité au moins, mais que notre méthode de lyse, pourtant douce et contrôlée, ne nous permet pas de la récupérer intacte. Aussi il sera intéressant dans un second temps d'optimiser cette étape afin de voir s'il est possible d'en récupérer une partie. Les enzymes D1C7Z3, A0KE01 et 3HMU quant à elles ne montrent aucune bande, même dans les débris cellulaires, on peut donc en conclure que ces trois enzymes ne sont pas produites.

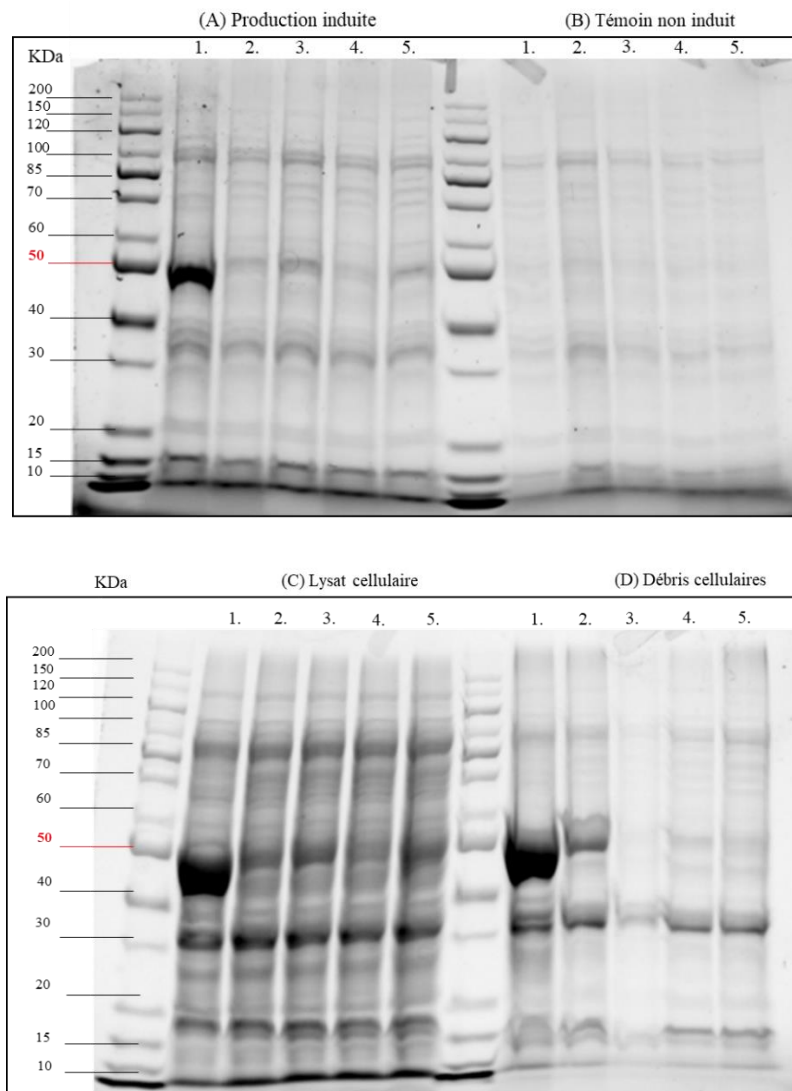


Figure 44 : Gels d'électrophorèse réalisés sur les lysats cellulaires après french press **A)** Production après induction à l'IPTG **B)** Témoin sans induction à l'IPTG **C)** Lysats cellulaires obtenus après FP **D)** Débris cellulaires obtenus après FP (**1.** B9AZ94 **2.** I2IXB4 **3.** D1C7Z3 **4.** A0KE01 **5.** 3HMU).

Au final, même si les 4 enzymes n'ont toujours pas pu être produites dans ces nouvelles conditions, ces dernières se sont avérées plus optimales que les précédentes pour la B9AZ94. En effet, une quantité supérieure de protéines totales a été obtenue (10.76 mg.ml⁻¹ de protéines totales, Tableau 13 contre 8.32 mg.ml⁻¹ de protéines pour la production précédente, Tableau 12).

Tableau 13 : Protéines totales et activités obtenues sur les lysats cellulaires (production en TB) des 5 enzymes thermostables.

Entrée	Enzymes	Protéines mg.ml ⁻¹	L-alanine	(S)-MBA
			Activités (mU.mg ⁻¹ de protéines totales)	
			HMF	Pyruvate
1	B9AZ94	10,76	117,85	75,96
2	I2IXB4	9,26	28,16	-
3	D1C7Z3	11,49	26,79	-
4	A0KE01	9,71	27,14	-
5	3HMU	10,56	20,31	-

Les résultats observés sur les gels d'électrophorèse ont ainsi, de la même manière que précédemment, pu être confirmés au niveau de la mesure des activités, en particulier avec le test à la (S)-MBA où seule la Bm-TA montre une activité sur le pyruvate (entrée 1, Tableau 13). De manière intéressante également, des activités spécifiques très similaires à celles obtenues précédemment ont pu être mesurées avec la B9AZ94. Il en va d'ailleurs de même pour les activités résiduelles observées avec le test à l'alanine dans le cas des autres enzymes, qui semblent donc bien dues aux enzymes constitutives de *E. coli* récupéré après la lyse cellulaire.

D'autres productions ont également été effectuées par la suite en faisant varier les paramètres (IPTG, temps d'induction, température d'induction), mais malheureusement nous n'avons pas réussi à obtenir les 4 autres enzymes, quelles que soient les conditions testées. Des discussions avec nos homologues de Greifswald sont d'ailleurs en cours en ce moment pour

essayer de comprendre d'où peut venir ce problème. Ainsi, en conclusion de cette partie, seule la B9AZ94 a pu être produite, mais elle s'est avérée très active sur le HMF, et a donc été sélectionnée pour une caractérisation plus fine, notamment au niveau de sa thermostabilité/thermoactivité.

3 Purification de la B9AZ94

Afin d'éviter toute interférence négative entre la présence de protéines non désirées présentes dans le lysat cellulaire et le catalyseur chimique mis en œuvre lors du procédé en IP1S, nous avons choisi pour cette fois de travailler sur enzyme purifiée. Ceci nous a de plus permis sa caractérisation de manière fine. Ainsi, nous avons profité de la présence d'un Tag 6x-His en position C-terminale de l'enzyme pour pouvoir la purifier sur résine IMAC. La Figure 45 représente les différentes fractions récupérées après la purification de la B9AZ94, suite à son élution à l'aide d'un tampon à concentration croissante en imidazole.

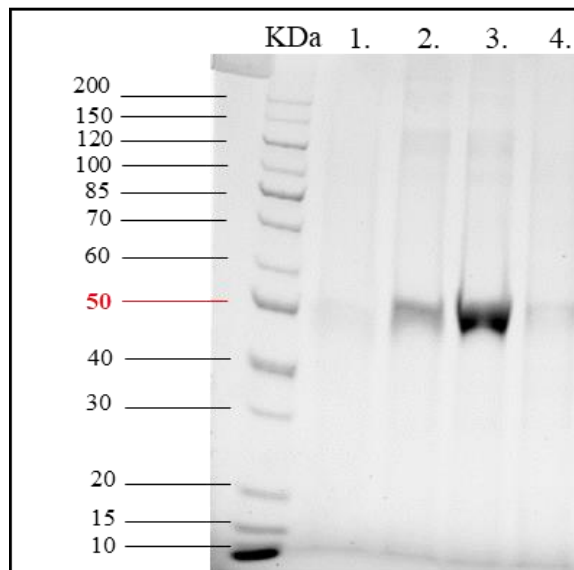


Figure 45 : Gels d'électrophorèse (gauche) effectués sur les différentes fractions de la purification de la B9AZ94 (1. Eaux de lavage 2. Fraction de tête 3. Fraction de corps 4. Fraction de queue).

On peut constater que comme espéré la fraction de corps présente une bien bande isolée aux alentours de 50 kDa qui se retrouve en plus faible intensité dans les fractions de tête et de queue, confirmant la bonne récupération de l'enzyme. Notons également que si la présence des

autres protéines d'*E. coli* n'est pas flagrante dans les eaux de lavage, c'est probablement, car celles-ci sont très diluées (Figure 46).

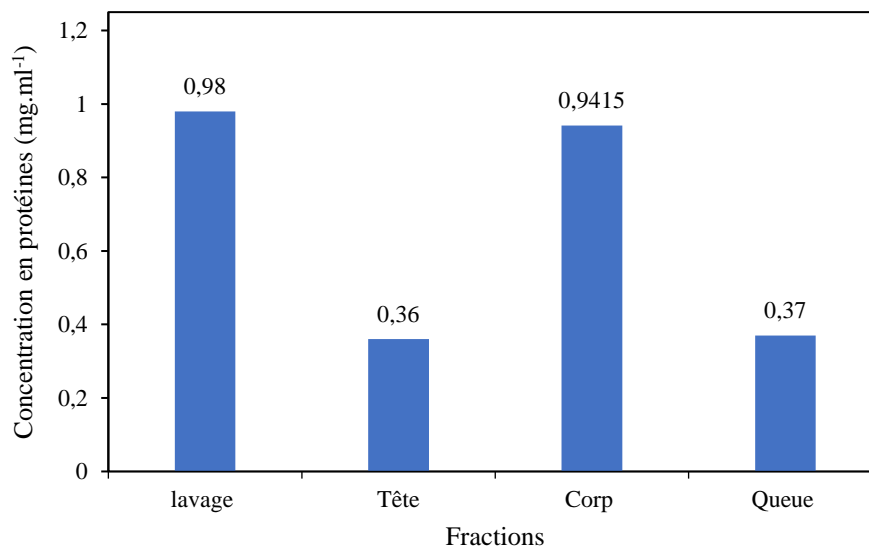


Figure 46 : Concentrations en protéines déterminées par Bradford à 595 nm post-purification de la B9AZ94 pour les fractions de lavage, de tête, de corps et de queue.

La fraction de corps a ainsi été récupérée et dialysée deux fois, une première fois afin de diminuer la quantité en imidazole et la seconde avec du sulfate d'ammonium afin de la conserver sous forme précipitée. Nous avons en effet choisi cette méthode de conservation, car elle est plus simple à mettre en œuvre que la lyophilisation, et car, les transaminases l'acceptent en général assez bien. Évidemment l'activité de l'enzyme précipitée a été vérifiée, et celle-ci peut bien être conservée de cette façon sans trop de perte. Pour terminer, l'activité spécifique de l'enzyme purifiée a été mesurée avec la (*S*)-MBA comme donneur et le pyruvate comme accepteur, et une valeur d'environ 1 U. mg⁻¹ a pu être obtenus dans ces conditions à 25 °C.

4 Caractérisation de la B9AZ94

Une étude de l'influence des différents paramètres (pH, température, oxydant...) sur l'activité de la *Bm*-TA purifiée a ensuite été réalisée grâce à un équipement reçu au cours de ma thèse, le CARY UV 3500, qui a permis de mettre au point un protocole généralisé pour la détermination directe de paramètres cinétiques enzymatiques, notamment lorsque le biocatalyseur est immobilisé.

4.1 Influence du pH sur l'activité enzymatique

Nous avons ainsi commencé par étudier l'influence du pH sur l'activité de l'enzyme. Une gamme de pH allant de 5,5 à 8 a pour cela été préparée. Un tampon citrate à 100 mM a été utilisé pour les pH 5,5 et 6, un tampon phosphate de potassium à 100 mM pour les pH 6 à 8, et un tampon TRIS (100 mM) pour le pH 8. Un recouvrement avec deux tampons aux pH 6 (tampon citrate et phosphate de potassium) et 8 (tampon phosphate de potassium et TRIS) a été effectué afin de vérifier l'effet tampon sur l'activité enzymatique. L'activité maximale (100 %) de la *Bm*-TA a ainsi été mesurée à pH 7,3 (Figure 47). On peut constater qu'elle conserve 94 % de son activité à pH 7,4 et 80 % à pH 7,5. Au-delà de ce pH, l'activité chute pour se situer entre 56 et 70 %. De manière intéressante, aucun effet tampon n'est observé entre le tampon phosphate de potassium et le tampon TRIS.

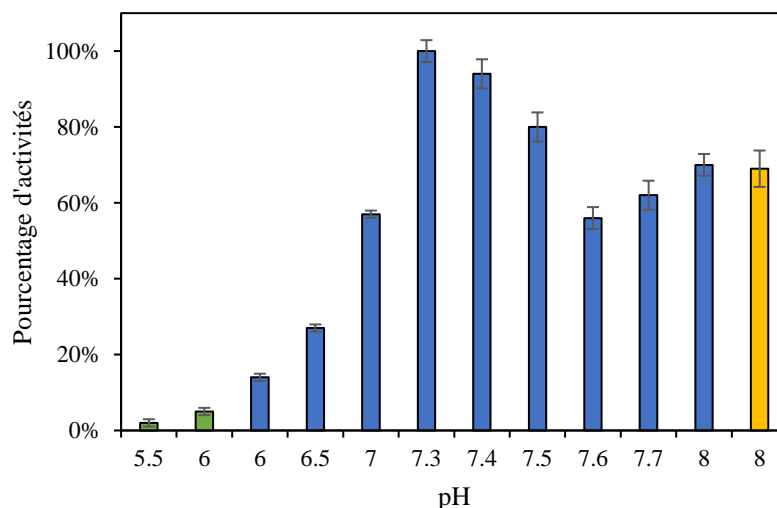


Figure 47 : Réaction de transamination du pyruvate par la *Bm*-TA sur une gamme de pH allant de 5,5 à 8 avec la (*S*)-MBA comme donneur d'amine. (pH 5,5 et 6 tampon citrate (■) 100 mM, pH 6 à 8 KH_2PO_4 (■)100 mM et pH 8 tampon TRIS (■)100 mM).

Du côté des pH acides, celle-ci diminue très vite entre 7 et 6. Notons également qu'à pH 6, un fort effet du tampon est observé entre le citrate et le phosphate, avec seulement 5 % d'activité contre 14 % respectivement.

Au vu de ces résultats, nous avons donc choisi d'utiliser un tampon phosphate pour le reste de nos expérimentations, avec une valeur de pH à 7,3.

4.2 Etude de l'immobilisation de la *Bm-TA*

Après avoir déterminé le pH optimal de la *Bm-TA*, nous nous sommes ensuite intéressés à choisir le meilleur support pour son immobilisation afin de voir si cela nous permettrait de la recycler, et/ou d'améliorer sa stabilité. Contrairement au chapitre précédent où l'immobilisation était directement faite sur le lysat cellulaire, ici la *Bm-TA* a été utilisée purifiée et nous avons commencé par une étude du taux d'immobilisation sur les trois supports EziG™OPAL, CORAL et AMBER que nous avons précédemment testés, en faisant varier le ratio enzyme/support (g/g) lors de l'immobilisation.

4.2.1 Sélection du support

De la même manière que précédemment, l'enzyme était mise en solution dans un tampon phosphate de potassium pH 7,3 à 100 mM avec 1 mM de PLP puis incubée avec chacun des 3 supports EziG™ selon 3 ratios enzyme/support différents (1/5, 1/10 et 1/15, g/g). Ensuite, 20 µl de surnageant étaient prélevés à 15, 30, 45 et 60 min et dosés par Bradford. La Figure 48 décrit les pourcentages d'immobilisation après 60 min d'incubation.

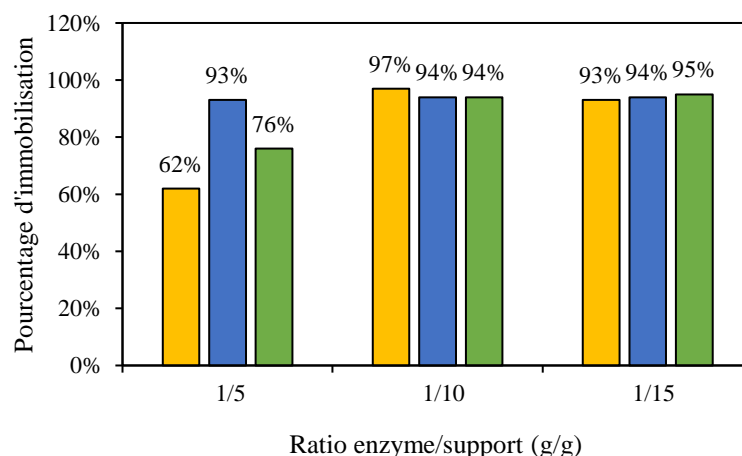


Figure 48 : Pourcentage d'immobilisation de la *Bm-TA* après 60 mn d'incubation à température ambiante dans un tampon KH_2PO_4 100 mM, pH 7,3 mesurée par Bradford à 595 nm sur OPAL (■), CORAL (■) et AMBER (■).

Pour les ratios 1/10 et 1/15, environ 100 % de la quantité d'enzyme se sont retrouvés immobilisés sur les trois supports. Le ratio 1/5 montre en revanche des disparités : seulement 62 % de l'enzyme sont immobilisés dans le cas du support OPAL contre 93 % et 76 % pour les supports CORAL et AMBER respectivement. Les deux derniers supports possèdent donc une capacité d'immobilisation plus importante pour cette transaminase. On remarque également que le taux d'immobilisation augmente avec l'hydrophobie du support, allant de 62 % pour le support OPAL le plus hydrophile jusque 93 % pour le support CORAL le plus hydrophobe. Afin de limiter les quantités de support et d'enzyme, nous avons ainsi sélectionné le ratio enzyme/support de 1/5 pour effectuer les tests d'activité. Une cinétique d'immobilisation est disponible en annexes C. Une incubation à température ambiante pendant une heure (similairement à la Q7NWX4) est suffisante pour immobiliser un maximum de l'enzyme. Aucune évolution significative n'est observée après 60 minutes.

4.2.2 Test d'activité de la *Bm-TA@EziGTM*

La Figure 49 présente les pourcentages d'activité obtenus avec la *Bm-TA@EziGTM* (ratio 1/5) en utilisant le test (*S*)-MBA/pyruvate (Figure 6, gauche) et le test (*S*)-MBA/HMF (Figure 49, droite) comme accepteur. Malgré un taux d'immobilisation plus faible, on peut constater que le support OPAL est légèrement plus efficace que les deux autres. Effectivement, les supports CORAL et AMBER montrent seulement une activité résiduelle de 82 et 83 % avec le pyruvate lorsque l'enzyme est immobilisée sur le support OPAL. Ces résultats sont confirmés par les tests enzymatiques réalisés sur le HMF où une activité résiduelle de 82 % et 83 % est retrouvée respectivement sur les supports CORAL et AMBER (Figure 49, droite).

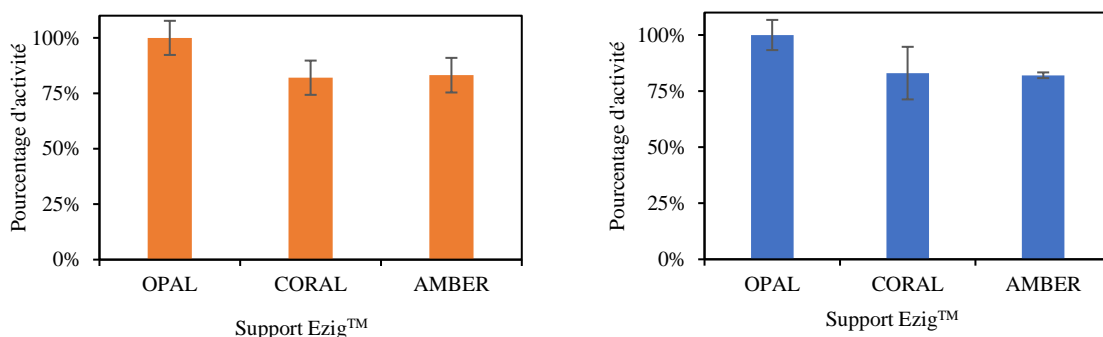


Figure 49 : Rendement d'activité de la *Bm-TA@EziGTM* (OPAL, CORAL et AMBER) sur le pyruvate (■) et sur le HMF (■) mesurés à 245 nm par la mesure de l'augmentation de la concentration en acétophénone. (Donneur (*S*)-MBA).

Aussi il est probable que la variation d'activité entre les différents supports ne soit pas uniquement due à l'enzyme, et à sa stabilisation/repliement, mais sûrement à d'autres facteurs, comme peut-être adsorption et la disponibilité du PLP sur le support. L'environnement hydrophile du support OPAL pourrait en effet peut-être permettre la fixation d'une plus grande quantité de PLP, ayant pour conséquence de diminuer le taux d'immobilisation enzymatique, mais en permettant à l'enzyme d'avoir du PLP en grande quantité et rapidement. Ces différentes hypothèses pourraient expliquer pourquoi, malgré un taux d'immobilisation plus faible, le support OPAL présente une activité légèrement supérieure aux deux autres supports. Cette hypothèse semble être confirmée par les résultats de la Figure 50 qui présente le taux de conversion du pyruvate au cours du temps avec la (*S*)-MBA comme donneur lorsque la *Bm*-TA est immobilisée avec un ratio 1/5 (g/g) sur les trois supports.

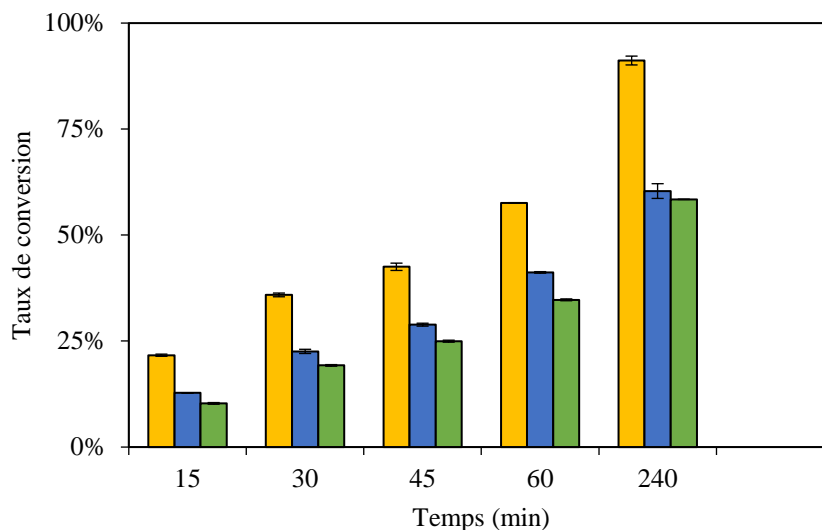


Figure 50 : Taux de conversion du pyruvate en alanine par la *Bm*-TA@EziGTMOPAL (■), *Bm*-TA@EziGTMCORAL (■), *Bm*-TA@EziGTMAMBER (■) avec un ratio d'immobilisation 1/5 (enzyme/support, g/g).

On peut constater une conversion complète du substrat initial après 4 h de réaction pour le support OPAL tandis que les supports CORAL et AMBER atteignent un taux de conversion respectif de 60 et 58 % en 4 h de réaction. Cela nous permet de confirmer là encore la sélection du support OPAL pour le développement du procédé 1P1S au cas où l'enzyme nécessiterait une immobilisation.

4.3 Influence d'oxydants chimiques sur la transamination

L'étape oxydative du procédé hybride 1P1S, prise en charge par le catalyseur chimique, pourrait potentiellement utiliser un oxydant afin d'accélérer la réaction vers la formation d'AMFC. En effet, plusieurs travaux préliminaires effectués au sein du laboratoire sur les nanoparticules métalliques utilisées ici, ont montré que la présence d'oxydants chimiques pouvait grandement renforcer l'activité de ceux-ci. Aussi, nous avons choisi de vérifier la capacité de l'enzyme à supporter la présence de ce type d'oxydants dans le milieu réactionnel. Pour cela nous avons mesuré l'activité de l'enzyme en présence d' H_2O_2 et de KMnO_4 . Ici, l'activité de la *Bm*-TA et de la *Bm*-TA@EziGTMOPAL est alors mesurée à l'aide du test à la (*S*)-MBA et du pyruvate, en présence de 5 concentrations de chaque oxydant (0,5, 1, 2, 3, 4 et 5 mM). En résultat, une dénaturation très rapide de l'enzyme libre et immobilisée a été observée en présence de KMnO_4 (même à 0,5 mM). Aucune activité initiale n'a été mesurée en présence de cet oxydant.

La Figure 51 représente les pourcentages d'activités mesurées sur la transamination du pyruvate en présence d'une concentration graduelle de H_2O_2 . Il est important de noter que ces pourcentages d'activités correspondent à une activité initiale mesurée, mais qu'une dénaturation rapide de l'enzyme a été observée (apparition d'un plateau sur la courbe de DO) pour les concentrations allant de 1 à 5 mM de H_2O_2 .

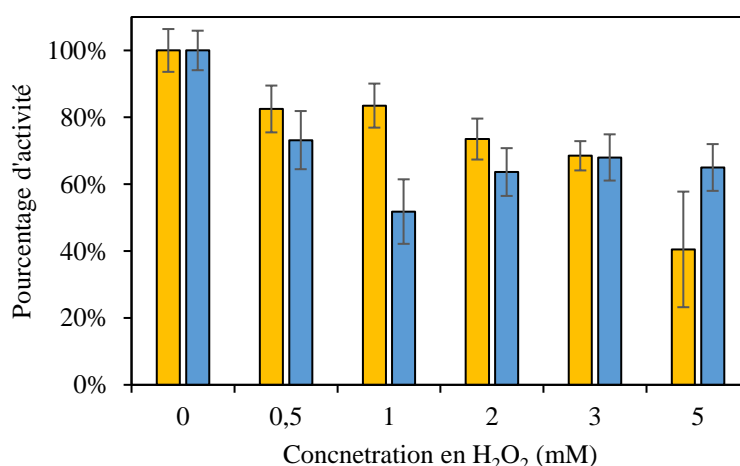


Figure 51 : Activité initiale mesurée sur la transamination du pyruvate avec la (*S*)-MBA comme donneur en présence d'une concentration graduelle de H_2O_2 (0, 0,5, 1, 2, 3, 4 et 5 mM) avec le *Bm*-TA libre (■) et immobilisée sur le support EziGTMOPAL (■).

Une diminution de l'activité initiale d'environ 17.5 % est constatée lorsqu'on ajoute 0,5 mM de H₂O₂ dans le milieu réactionnel comparé au milieu sans oxydant pour la *Bm*-TA libre. La diminution de l'activité est relativement similaire lorsque l'enzyme est immobilisée (25 %). Sur une faible concentration en H₂O₂ (ici 0.5 mM), le fait d'immobiliser l'enzyme ne permet pas de conserver une activité supérieure. Cependant, lorsqu'on introduit 5 mM de H₂O₂ dans le milieu réactionnel la *Bm*-TA@EziGTMOPAL conserve 65 % de son activité initiale contre seulement 40 % pour la *Bm*-TA. On peut donc supposer que le fait d'immobiliser l'enzyme permet de la protéger partiellement contre une suroxydation par un oxydant chimique, mais seulement dans une durée très limitée.

À partir de ces résultats, et si nous confirmons que l'ajout d'un oxydant chimique permet effectivement d'augmenter la conversion du HMFA en AMFC, la quantité de H₂O₂ ajoutée dans le milieu réactionnel ne devra pas excéder 0,5 mM.

4.4 *Stabilité et activité thermique*

Après l'étude du pH, et l'influence de la présence d'oxydants dans le milieu réactionnel, l'étude de l'impact de la température a été étudiée sur l'activité de la *Bm*-TA. Une gamme de températures allant de 15 °C à 85 °C avec un pas de 5 °C a été testée. Nous avons utilisé une fois encore le spectrophotomètre CARY 3500, qui possède 8 cuves et peut être subdivisé en 1,2 ou 4 zones de températures indépendantes, afin d'accélérer cette étape. Ici, l'activité a été mesurée avec le test à la MBA et le HMF directement comme accepteur afin d'être au plus près des conditions réactionnelles finales. Dans le cas de l'enzyme immobilisée, un ratio enzyme/support de 1/5 (g/g) a été utilisé comme décrit précédemment. La Figure 52 présente les résultats obtenus lors de cette étude. Dans le cas de l'enzyme libre comme de l'enzyme immobilisée, on remarque que le maximum d'activité se situe à 60 °C. Passé cette température, une perte progressive de l'activité est observée jusqu'à environ 9 % de son activité maximale pour l'enzyme libre à 85 °C et environ 30 % pour l'enzyme immobilisée. Nous pouvons donc conclure ici que le fait d'immobiliser l'enzyme lui permet de conserver une meilleure activité thermique. La perte progressive de l'activité à 60 °C suggère que cette température est la température de dénaturation de l'enzyme. Cette hypothèse a été étayée par la mesure de la température de dénaturation de la *Bm*-TA en utilisant l'appareil PROMETHEUS. Cet appareil est équipé d'une rampe de températures qui permet de déplier lentement la protéine, libérant ainsi les résidus aromatiques présents au sein de la protéine qui se traduit par un point

d'inflexion de la fluorescence de cette dernière, qui est mesuré l'appareil. Concernant la *Bm*-TA, une température d'environ 59 °C a ainsi été mesurée, correspondant parfaitement avec l'activité thermique maximale mesurée à 60 °C. Cette température représente donc la valeur maximale à ne pas dépasser dans notre procédé en 1P1S. Ajoutons également que si l'immobilisation de l'enzyme permet de limiter sa dénaturation au-dessus de 60 °C, elle ne permet en revanche pas d'obtenir une meilleure thermoactivité maximale, et n'apporte donc pas de réel avantage à cette température, tout du moins sur ce point.

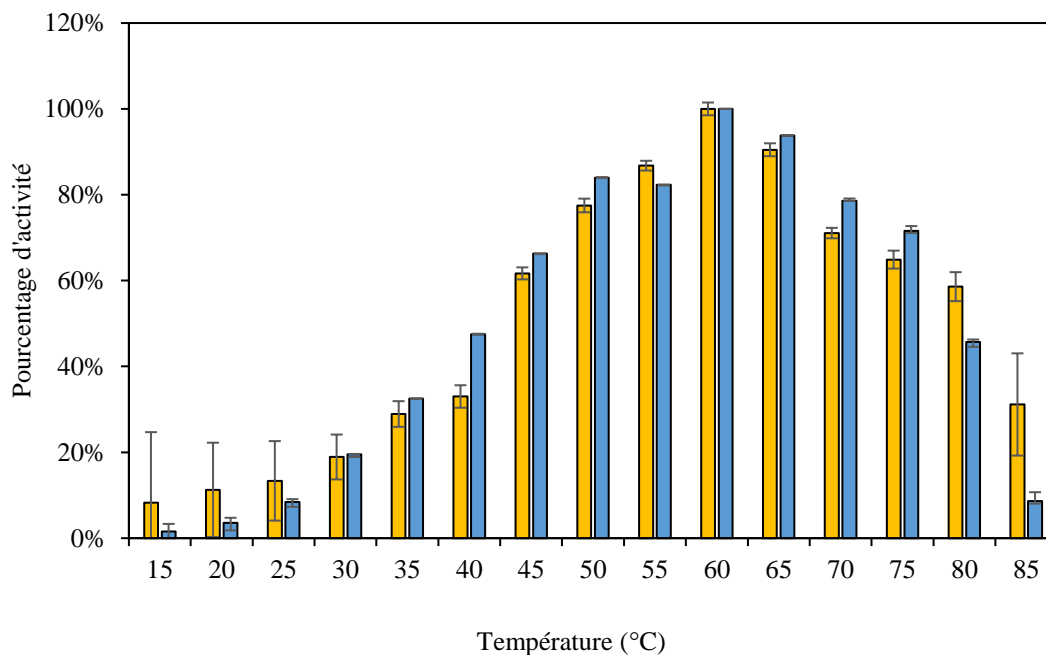


Figure 52 : Thermo activité de la *Bm*-TA (■) et de la *Bm*-TA@EziG™OPAL (■) mesurées au CARY UV 3500 par l'intermédiaire du test avec la (*S*)-MBA (mesure de l'augmentation de l'acétophénone à 245 nm) de 15 °C à 85 °C avec un pas de 5 °C.

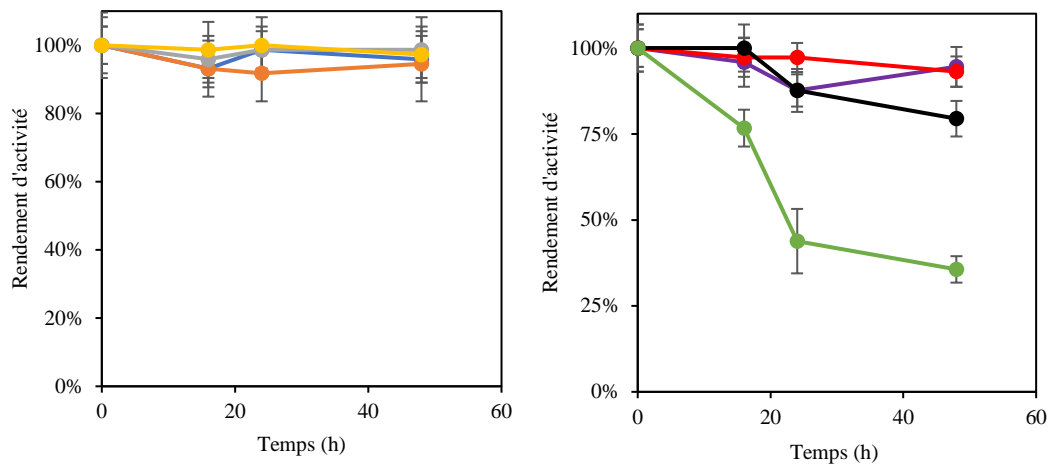


Figure 53 : Stabilité thermique de la *Bm*-TA à 30 (●), 35 (○), 40 (●), 45 (●), 50 (●), 55 (●), 60 (●) et 65 °C (●) mesurée au CARY UV 3500 après 16, 24 et 48 h d'incubation dans un tampon KH_2PO_4 , 100 mM, pH 7,3. Activité mesurée grâce au test avec la (*S*)-MBA et le HMF comme accepteur.

Nous avons ensuite étudié la thermostabilité de B9AZ94 avec l'enzyme libre dans un premier temps (Figure 53). Pour cela l'enzyme a été incubée pendant 48 h (temps approximatif de nos procédés hybrides) aux différentes températures suivantes : 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 et 65 °C. Un prélèvement à intervalles réguliers était alors effectué, et l'activité de l'enzyme était ensuite mesurée à 30 °C avec la MBA et le HMF. En résultats, nous pouvons remarquer que jusque 55 °C, l'enzyme possède toujours 100 % de son activité initiale après 48 h d'incubation. À partir de 60 °C, une chute est observée et seulement 80 % de l'activité initiale sont récupérés au bout des deux jours. Ceci semble concorder avec la température de dénaturation de l'enzyme est située aux alentours de 59 °C. Notons également qu'à partir de 65 °C, la *Bm*-TA se dénature rapidement au cours du temps et que seulement 35 % de l'activité initiale sont récupérés après 48 h d'incubation. Ces résultats sont étayés par l'observation d'un précipité blanchâtre dans le milieu qui correspond probablement à l'enzyme dénaturée. Ce faisant, en nous basant sur ces résultats, nous avons sélectionné une température maximale de 55 °C pour la mise au point d'un procédé en 1P1S avec l'enzyme libre afin d'être sûrs de pouvoir conserver son activité sur toute la durée de la réaction.

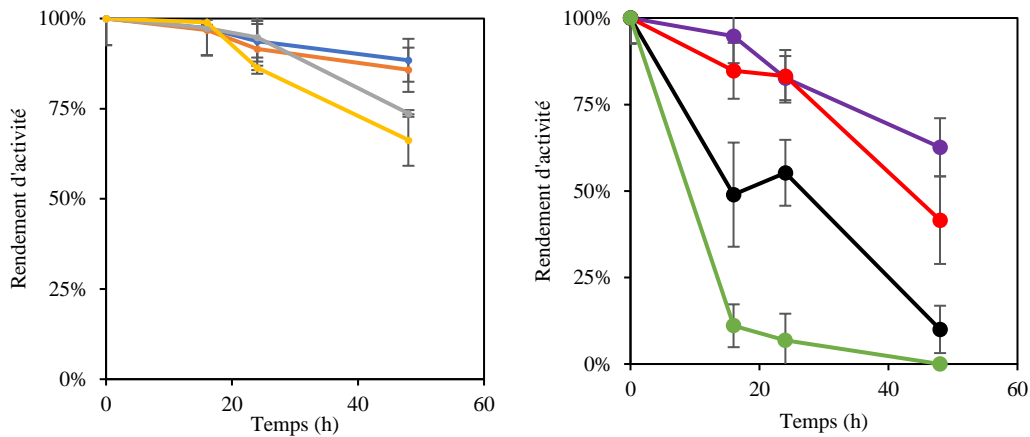


Figure 54 : Stabilité thermique de la *Bm-TA@EziG™OPAL* à (●), 35 (○), 40 (●), 45 (●), 50 (●), 55 (●), 60 (●) et 65 °C (●) mesurée au CARY UV 3500 après 16, 24 et 48 h d'incubation dans un tampon KH_2PO_4 , 100 mM, pH 7,3. Activité mesurée grâce au test avec la (*S*)-MBA sur le HMF.

De la même manière, l'étude de thermostabilité de la *Bm-TA@EziG™OPAL* à été effectuée à 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 et 65 °C sur 48 h (Figure 54). Ici nous pouvons constater, avec surprise, une perte d'activité au cours du temps dès 30 °C. En effet, après 48 h d'incubation, à cette température seulement 88 % de l'activité initiale sont retenus. La perte d'activité est ensuite d'autant plus forte que la température augmente. Seuls 66 % de l'activité sont retrouvés après 48 h à 45 °C. À la température de dénaturation de l'enzyme (60 °C), une perte de 90 % est observée en 48 h. Et une complète dénaturation de l'enzyme est observée à 65 °C sur le même temps. Ajoutons que sur le plan macroscopique, les milieux réactionnels qui ont subi une perte d'activité voyaient le support (initialement jaune) se décolorer progressivement jusqu'à devenir blanc. Nous avons alors supposé que cette décoloration était corrélée à la dénaturation enzymatique, et qu'elle traduisait la perte d'activité. Au regard des hypothèses précédentes, cela semble confirmer que le support OPAL n'est pas le meilleur pour maintenir la stabilité de l'enzyme, et que la différence d'activité entre les supports serait bien liée à une interaction différente avec le PLP, qui apporte d'ailleurs la couleur jaune au support après l'immobilisation. Il serait ainsi intéressant d'étudier la thermostabilité de l'enzyme sur l'AMBER et le CORAL pour voir si leur plus grande hydrophobie n'améliore pas cet aspect. Aussi, dans les conditions présentes, l'immobilisation de la *Bm-TA* sur le support *EziG™OPAL*, excepté le fait qu'elle permette de récupérer et potentiellement recycler l'enzyme, n'a pas montré une amélioration de sa stabilité thermique, et ne semble donc pas pertinente pour la mise au point du procédé en 1P1S.

5 Synthèse et caractérisation de nouveaux catalyseurs

Commençons par rappeler que le chapitre 1 de la partie résultats & discussions de cette thèse nous a permis de constater que les 15 catalyseurs que nous avons criblés dans un premier temps possédaient déjà une activité sur le HMFA. Cependant, une compétition entre deux chemins réactionnels, la désamination oxydative et l'oxydation de la fonction alcool, avait été observée. La recherche du catalyseur chimique s'est donc focalisée sur la sélection d'un catalyseur capable de convertir le HMFA en furfurylamine(s) sans réaliser de désamination oxydative. Pour cela, nous avons réalisé l'étude de 23 nouveaux catalyseurs, majoritairement à base d'or, dans la mesure où ce métal semblait le plus prometteur concernant ce dernier point.

Contrairement à précédemment, où plusieurs méthodologies de synthèses avaient été utilisées (imprégnation humide, co-précipitation, réduction-précipitation), tous les catalyseurs ont cette fois-ci été préparés en utilisant un protocole de « sol immobilisation ». Cette procédure se définit par la formation d'une suspension colloïdale de nanoparticules métalliques qui est réduite puis immobilisée sur le support adéquat. Comme décrit dans la littérature, le support joue un rôle important dans les propriétés catalytiques des catalyseurs chimiques. Pour avoir un aperçu des différents supports, deux supports réductibles (TiO_2 et CeO_2 , capables de stocker et fournir de l'oxygène lors des réactions) ont été choisis. Le SiO_2 a quant à lui été sélectionné pour sa capacité inerte. Les MgO et CaO ont été choisis pour leurs propriétés basiques, alors que le ZrO_2 pour sa composition en sites à la fois acides et basiques. Toujours en utilisant la même approche de synthèse, trois catalyseurs bimétalliques Au-Pd ont également été synthétisés avec différents ratios sur du TiO_2 . La synthèse de ces derniers a été effectuée dans le but d'observer un effet de synergie potentiel entre les nanoparticules de palladium et d'or. Comme vu dans la littérature, les NPs d'or sont plus efficace pour convertir la fonction aldéhyde en acide carboxylique^{133,134} tandis que les nanoparticules de palladium peuvent potentiellement activer la fonction alcool pour la convertir en aldéhyde. Nous espérons donc pousser l'oxydation vers la formation de l'AMFC en couplant les propriétés catalytiques des nanoparticules d'or et de palladium. Afin de servir de référence à cette comparaison, le Pd@TiO_2 a donc été ajouté à la liste des catalyseurs criblés. Pour finir, ajoutons que le support EziGTM@OPAL, jusque-là utilisé pour l'immobilisation des enzymes, a également été inclus à la liste, notamment dans l'objectif à plus long terme d'envisager la création d'un matériau multicytalytique hybride à partir de ce dernier. De manière additionnelle, des nanoparticules de palladium et de platine ont également été immobilisées sur ce support, dans la même optique.

De la même manière, nous avons également ajouté à la liste des supports pour l'immobilisation des nanoparticules d'or, le UiO-66-NH₂. Ce *metal-organic framework* (MOF), a été testé dans la mesure où il devrait permettre une co-immobilisation sous forme compartimentée d'enzymes et de nanoparticules métalliques. Il était donc intéressant de voir si nous pouvions au préalable déjà immobiliser des nanoparticules d'or seules sur ce matériau, et si ces dernières étaient actives pour des réactions d'oxydation. Au final, la liste complète des catalyseurs est présentée dans le Tableau 14. La caractérisation XPS de certains catalyseurs est disponible en annexe C.

Tableau 14 : Liste des catalyseurs utilisés pour l'oxydation du HMFA.

Entrée	Code du catalyseur	% Métal content	Métal	Support	Procédé
1	C1	1,13*	Au	Al ₂ O ₃	Réduction-précipitation
2	C3	1,6*	Au	CaO	Sol immobilisation
3	C4	2.29*	Au _{PVA}	CaO	
4	C5	6,87*	Au	CeO ₂	
5	C6	1,8*	Au	MgO	
6	C8	0,9*	Pd	TiO ₂	
7	C10	1,5*	Ru	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Imprégnation humide
8	C12	0.28–0,47*	Au-Pd	ZrO ₂	Sol immobilisation
9	C13	1.04–0.48**	Au-Pt	TiO ₂	Co-précipitation
10	C14	0.9–0,93*	Pt-Pd	Al ₂ O ₃	
11	C15	0.96–0.92*	Pt-Pd	TiO ₂	
12	C16	5,6*	Au	OPAL	Imprégnation humide à l'excès du solvant
13	C17	1**	Ru	SiO ₂	Sol immobilisation
14	C18	5**	Ru	SiO ₂	
15	C19	2**	Au	Fe ₃ O ₄	
16	C20	2**	Pd	Fe ₃ O ₄	

HybCat4Bio – Chapitre 3

17	C21	2**	Pd	Fe ₃ O ₄
18	C22	1,92*	Au	CeO ₂
19	C23	0,61*	Au	SiO ₂
20	C24	2**	Au	UiO-66_NH ₂
21	C26	2**	Pd	CN
22	C27	2**	Ir	CN
23	C28	2**	Pt	CN
24	C29	1.41*	Pd	OPAL
25	C30	0.83*	Pt	OPAL
26	C31	1.80*	Au	TiO ₂
27	C32	0,49*	Au	MgO
28	C33	0,09*	Au	ZrO ₂
29	C34	1,57*	Pd	MgO
30	C35	0,95*	Pd	TiO ₂
31	C36	0.16-0.5*	Au-Pd	TiO ₂
32	C37	0.32-0,17*	Au-Pd	TiO ₂
33	C38	0.43-0,13*	Au-Pd	TiO ₂

*Déterminé par ICP ** valeurs nominales

6 Criblage des catalyseurs pour l'oxydation du HMFA.

6.1 Criblage en vial de 2 mL

Un premier criblage manuel (en vial) similaire à celui effectué dans le chapitre 1 a été réalisé dans un premier temps afin de faire une présélection de catalyseurs actifs sur le HMFA. Les conditions étaient ajustées par rapport aux résultats d'activités enzymatiques obtenus précédemment. De la même façon que précédemment, les réactions ont été réalisées dans des vials de 2 mL scellés afin de limiter l'évaporation. Comme nous l'avons relevé dans le sous-chapitre précédent, la *Bm*-TA sous forme libre et immobilisée commence à présenter une certaine instabilité dans le temps à partir de 60 °C. Aussi, pour cette raison, nous avons abaissé la température de notre nouveau criblage à 50 °C dans l'espoir de trouver des catalyseurs plus compatibles encore avec l'enzyme. De la même manière, nous avons choisi de nous placer à un pH de 7,3 afin de rester au plus proches des conditions optimales de fonctionnement de la transaminase. Les résultats du criblage réalisé sur les 33 catalyseurs placés dans ces conditions (Figure 55) sont ainsi présentés en Figure 56. Nous pouvons dans un premier temps constater que les conditions ici utilisées nous ont permis limiter tout mécanisme de désamination oxydative. Effectivement aucune trace de HMF n'est observée dans les milieux avec aucun des catalyseurs. La diminution du pH, à une valeur de 7,3, semble ainsi être un paramètre important concernant cette réaction parasite, comme cela le sera confirmé par la suite.

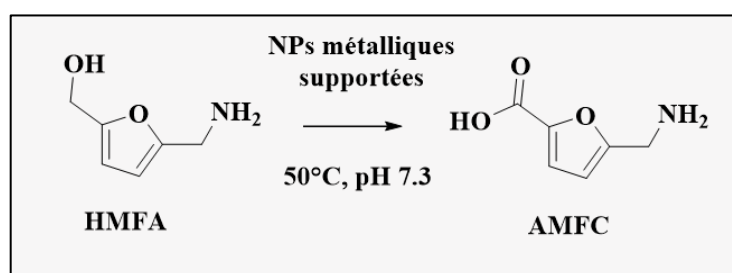


Figure 55 : Schéma réactionnel de l'oxydation du HMFA en AMFC.

Parmi les 33 catalyseurs testés, 9 catalyseurs ont ainsi montré la capacité à produire de l'AMFC dans leur milieu après 48 h de réaction à 50 °C. Pour commencer, les catalyseurs C35 et C37 (Pd@TiO₂ et Au_{0,32}-Pd_{0,17}@TiO₂, entrée 30 et 32, Tableau 14) n'ont montré qu'une faible conversion du HMFA en AMFC (respectivement 4,8 et 3,5 %). Contrairement à ce que

nous avons espéré, le fait de doper les nanoparticules d'or avec du palladium n'a pas permis d'augmenter la conversion du HMFA en AMFC.

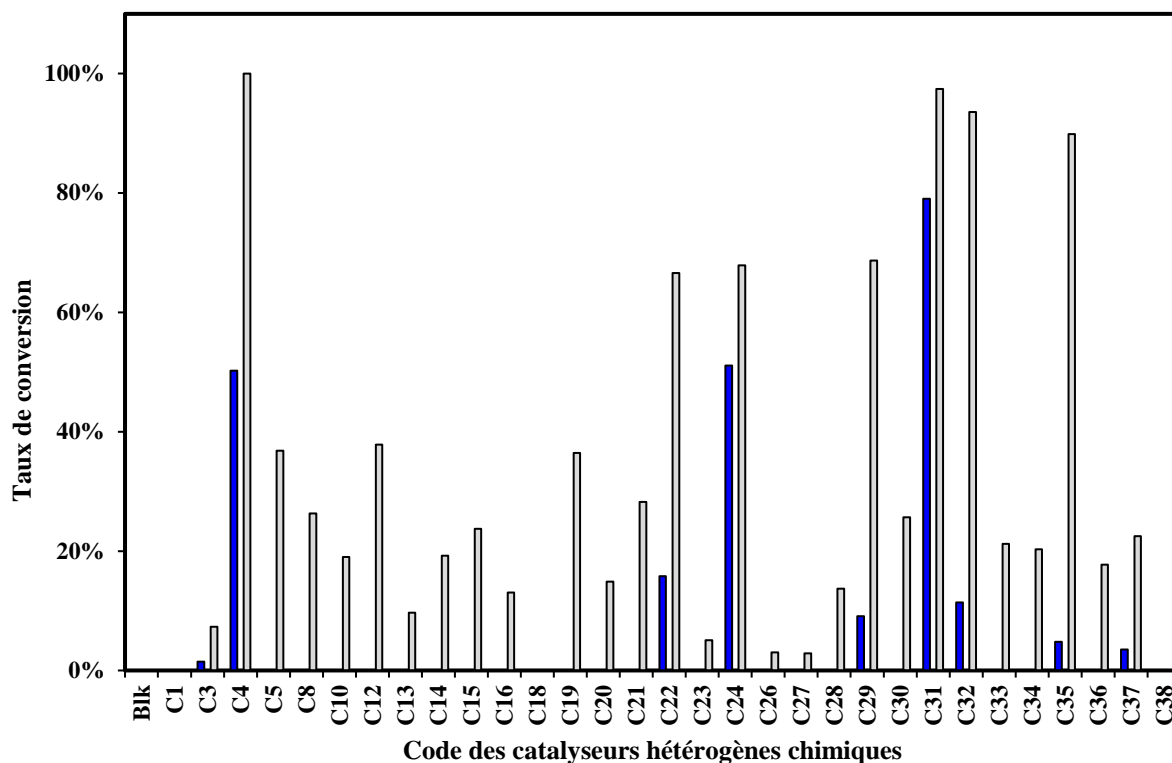


Figure 56 : Pourcentage de conversion du HMFA (■) et rendement envers l'AMFC (■) observé lors du criblage d'oxydation manuel par 33 catalyseurs dur le HMFA à 50 °C dans un tampon phosphate de potassium (pH7.3, 100 mM).

Les catalyseurs Au@MgO et Au@CaO ont quant à eux montré une conversion élevée du HMFA (>99 % et 84 % respectivement), mais seuls 18 % et 51 % d'AMFC ont été détectés après 48 h d'oxydation. Ajoutons que la réaction ne semble pas non plus s'être arrêtée au niveau de l'aldéhyde (AMFA) car celui-ci disparaît également du milieu réactionnel et n'est pas retrouvé après 48 h (Figure 57).

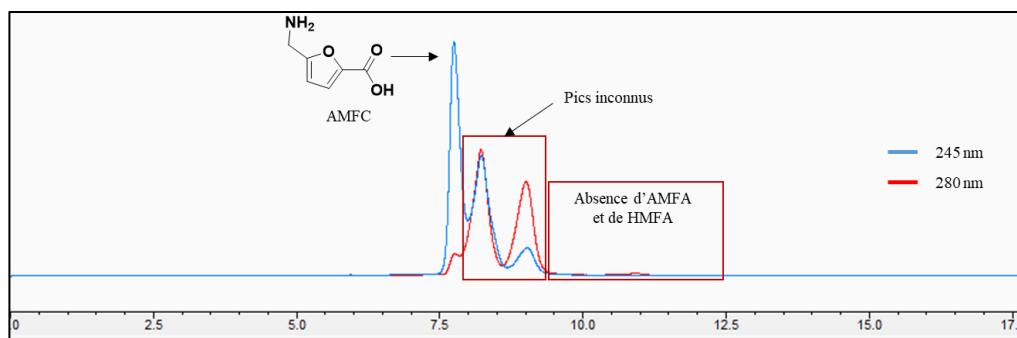


Figure 57 : Chromatogramme HPLC du milieu réactionnel pour l'oxydation du HMFA en vial par le catalyseur Au@CaO (C4).

En revanche, l'apparition d'un précipité dans le milieu réactionnel, tout au long de la réaction, nous a laissés penser qu'en plus de l'oxydation, ces catalyseurs étaient peut-être en mesure de catalyser la polymérisation des composés aminés. Cette observation sera d'ailleurs confirmée par la suite lors de la réaction en 1P1S, et de plus amples caractérisations de ce polymère sont actuellement en cours.

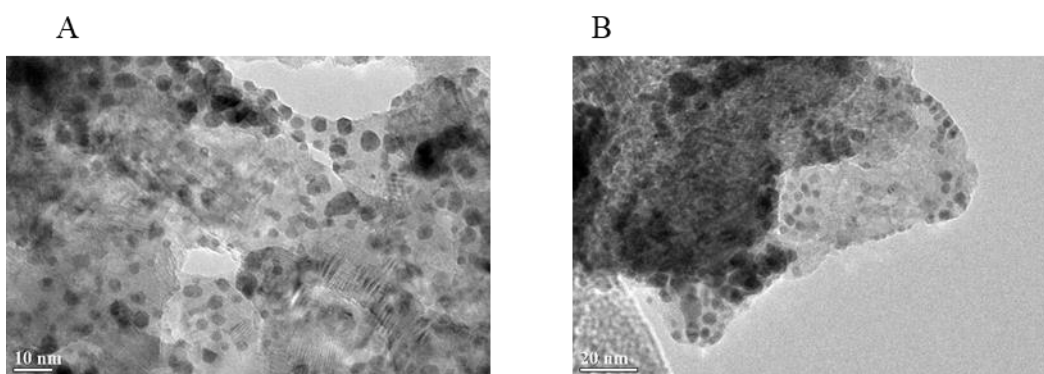


Figure 58 : Images TEM de Au@CaO (A 10 nm, B 20 nm).

Cela dit, dans le cas spécifique du catalyseur Au@CaO, le fait d'observer une conversion complète de l'intermédiaire (HMFA) était un résultat très encourageant. De plus, cela semble cohérent avec le type de support utilisé dans la mesure où plusieurs travaux de la

littérature^{118,119} décrivent la nécessité pour que l'or puisse effectuer l'oxydation de la fonction alcool, que celle-ci soit déprotonnée. Or le CaO présente des sites basiques qui pourraient mimer la présence d'une base dans le milieu réactionnel.

De manière inattendue, le catalyseur C24 (Au@UiO-66-NH₂) a montré l'un des meilleurs taux de conversion avec 52 % d'AMFC produits après 48 h de réaction. Cependant, il est tout de même intéressant de noter que, dans le cas de ce support, le milieu réactionnel s'est graduellement teinté de violet tout au long de la réaction, laissant supposer un relargage important des nanoparticules d'or dans le milieu réactionnel. Notons également que la présence de pics caractéristiques du ligand organique du MOF, l'acide 2-aminotéréphtalique, ont été détectés en RMN ¹H du surnageant, décrivant soit un mauvais rinçage du MOF après sa synthèse, soit une certaine instabilité de ce dernier dans les conditions de réaction actuelles, pouvant étayer la présence de ce relargage. Ajoutons que l'activité ici détectée semble tout de même bien être due aux nanoparticules immobilisées sur le support solide, et non à celles en solution, car celles-ci sont censées être très peu, voire pas, actives sous cette forme. Ceci a d'ailleurs été confirmé par la suite lors du second criblage, qui est décrit plus bas dans ce chapitre.

En réponse à la question posée concernant la possibilité de réaliser un matériau multicatalytique hybride avec le support utilisé pour l'enzyme, parmi les catalyseurs C16, C29 et C30 (respectivement Au@OPAL, Pd@OPAL et Pt@OPAL) le catalyseur au palladium est le seul à avoir fait preuve d'une véritable activité, avec presque 69 % du HMFA consommé, mais seulement 9 % d'AMFC formés. A contrario les catalyseurs à l'or et au platine ont montré seulement 12 % et 29 % de conversion du HMFA, et se sont arrêtés à la production d'AMFA, confirmée en HPLC-DAD. Aucune trace d'AMFC n'est observée dans le cas de ces deux catalyseurs.

Ajoutons également que l'utilisation d'EziGTMOPAL comme support pour les nanoparticules d'or n'a pas semblé être idéal dans la mesure où, contrairement au Pd la concentration en métal est restée raisonnable avec 1,4 %, celle de l'or avoisinant les 5,6 % s'est révélée beaucoup plus élevée qu'attendue. Or ce type de comportement pourrait traduire une agglomération des nanoparticules d'or entre elles à la surface du matériau, et donc la diminution de leur capacité catalytique, cette dernière étant très généralement inversement proportionnelle à la taille des nanoparticules. Concernant le platine en revanche, le taux d'immobilisation s'est révélé particulièrement bas (0,8 %), et il se peut que la quantité de métal ne soit simplement pas suffisante. Évidemment, une dernière hypothèse concerne la nature même du support, qui peut

conférer de propriétés catalytiques différentes aux 3 métaux. Malgré tout, ces trois catalyseurs ont tout de même été incorporés lors de notre criblage suivant pour confirmer ou infirmer ces premières observations.

Pour terminer, le catalyseur qui s'est montré de loin le plus efficace pour la production d'AMFC lors de ce premier criblage a été le Au@TiO₂ avec 97 % de conversion du HMFA après 48 h, pour un rendement de 79 % en molécule cible. Notons que, comme le Au@CeO₂, qui a également montré une certaine activité avec 44 % de conversion et 16 % d'AMFC formés, Ce catalyseur utilise un support réductible. Ce faisant, il se peut que ce type de support puisse effectivement aider à cette étape d'absorption, faillant alors la réaction d'oxydation dans son ensemble. Ajoutons que l'analyse TEM de ces deux catalyseurs a confirmé la présence de très petites particules d'or (environ 3 nm, Figure 59), compatibles avec une bonne activité catalytique.

En conclusion de ce premier criblage, nous avons donc pu obtenir un premier set de différents catalyseurs capables de convertir le HMFA en AMFC, sans réaliser de réaction de désamination oxydative dans ces conditions. Parmi eux, on citera en priorité, le Au@TiO₂, le Au@UiO-66-NH₂, le Au@CaO et le Au@CeO₂. De manière très intéressante également, et contrairement à ce que nous pouvions attendre, ces catalyseurs se sont révélés actifs à *basse* température (50 °C), ainsi qu'à un pH de 7,3, proche de la neutralité. L'ensemble de ces résultats nous laisse ainsi présager de la possibilité de réussir à mettre au point notre système de production de l'AMFC, à partir du HMF, en passant par le HMFA comme molécule intermédiaire, comme proposé précédemment.

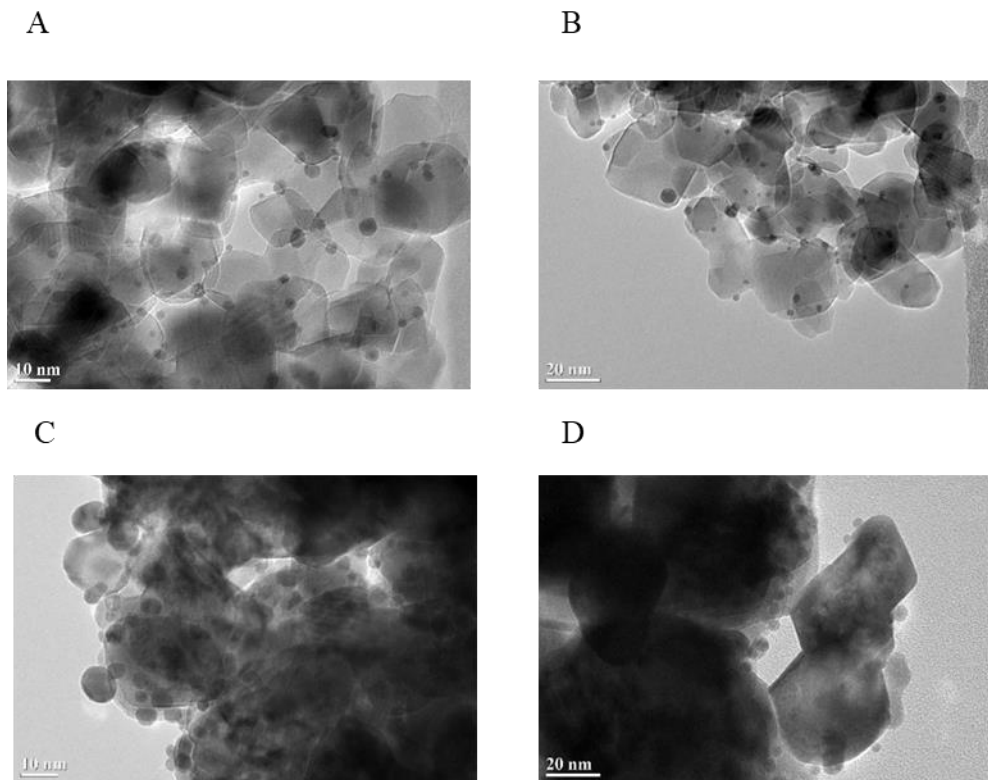


Figure 59 : Images TEM de Au/TiO₂ (A 10 nm, B 20 nm) et de Au/CeO₂ (C 10 nm D 20 nm).

Afin de confirmer puis de compléter ces premiers résultats, et en accord avec les tests précédemment effectués sur la transaminase, nous avons voulu reproduire ce premier criblage, en en profitant pour tester également l'ajout d'oxydants chimiques dans le milieu. Cependant, afin de ne pas perdre trop de temps lors de cette étape, mais également d'ouvrir la possibilité par la suite de faire varier un nombre de conditions réactionnelles plus important, nous avons choisi de réaliser la mise au point d'une méthode de criblage automatisée cette fois, basée sur un équipement à haut débit, le BioLectorPro[®]. De manière cocasse, cet appareil est normalement destiné au criblage de fermentations microbiennes, et n'a d'ailleurs jamais été reporté pour l'étude de catalyseurs chimique, domaine qui en est très éloigné. Cependant, plusieurs de ses propriétés techniques se sont révélées comme de précieux avantages pour nos criblages, comme la possibilité d'avoir une phase gaz plus importante (les plaques n'étant pas hermétiquement fermées, mais l'évaporation du milieu étant tout de même contrôlée par saturation de la cuve en vapeur d'eau), une bonne agitation et homogénéisation du milieu, un maintien précis de la température (contrairement à l'étuve utilisée jusque-là), ou encore et surtout la possibilité de faire des prélèvements automatisés tout au long de la réaction à l'aide du robot de pipetage qui lui est couplée.

6.2 *Mise au point d'un programme robotisé pour le criblage de catalyseurs chimiques pour l'oxydation du HMFA en AMFC*

Le BioLector Pro[®] (BLP) est un appareil initialement conçu pour des applications biologiques. Il permet en particulier d'effectuer des fermentations avec un contrôle précis de la croissance en microorganisme, du pH et de la concentration en oxygène dissout, paramètres qu'il permet d'ailleurs de mesurer tout au long de l'expérience à l'aide de capteurs intégrés à chaque « fermenteur ». Également équipé d'un système de microfluidique intégré, il offre la possibilité d'effectuer du fed-batch, ce qui est particulièrement pratique pour étudier l'influence d'un composé sur la culture. L'ensemble des réactions prennent alors la forme au sein du BioLector Pro d'une seule plaque, composée de 48 puits (ou « fermenteurs ») qui sont donc contrôlables et observables de manière indépendante. Pour ajouter à la flexibilité de l'équipement, ce dernier a été intégré par la plateforme REALCAT à un automate de pipetage permettant d'effectuer des prélèvements à des temps voulus, afin de pouvoir réaliser des analyses et caractérisations à l'issue de l'expérience sur ces derniers. Ce sont donc toutes ces fonctionnalités que nous avons choisi de détourner pour pouvoir réaliser le criblage de nos catalyseurs chimique de la manière la plus contrôlée et robuste possible. Une telle expérience peut alors être conduite comme présenté dans la Figure 60. La première étape de cette routine robotisée consiste à préparer la plaque en introduisant les milieux réactionnels et le catalyseur désiré (microorganisme, enzyme, ou dans notre cas catalyseur chimique). Ensuite, la plaque est fermée avec deux films. Le premier un film en caoutchouc permettant de sceller la plaque tout en la rendant utilisable avec les aiguilles du robot. Le second, imperméable sauf à certains endroits précis, permet quant à lui de limiter l'évaporation des milieux réactionnels. Une fois la plaque introduite dans le BLP, le programme est lancé et un premier prélèvement (30 µl) des milieux réactionnels (considéré comme le début de la réaction) est effectué avec les aiguilles de prélèvements. Le programme robot est disponible en annexe. Chaque prélèvement est alors stocké dans une plaque 96 puits, scellés par un film, recouverte d'un couvercle afin de limiter l'évaporation et placé à 4 °C sur le plateau du robot jusqu'à ce que l'expérimentateur vienne la chercher pour analyser l'avancement de la réaction par HPLC-DAD. La plaque est alors incubée (à 50 °C dans notre cas), pendant toute la durée de l'expérience, et des prélèvements successifs sont effectués pour réaliser la cinétique réactionnelle.

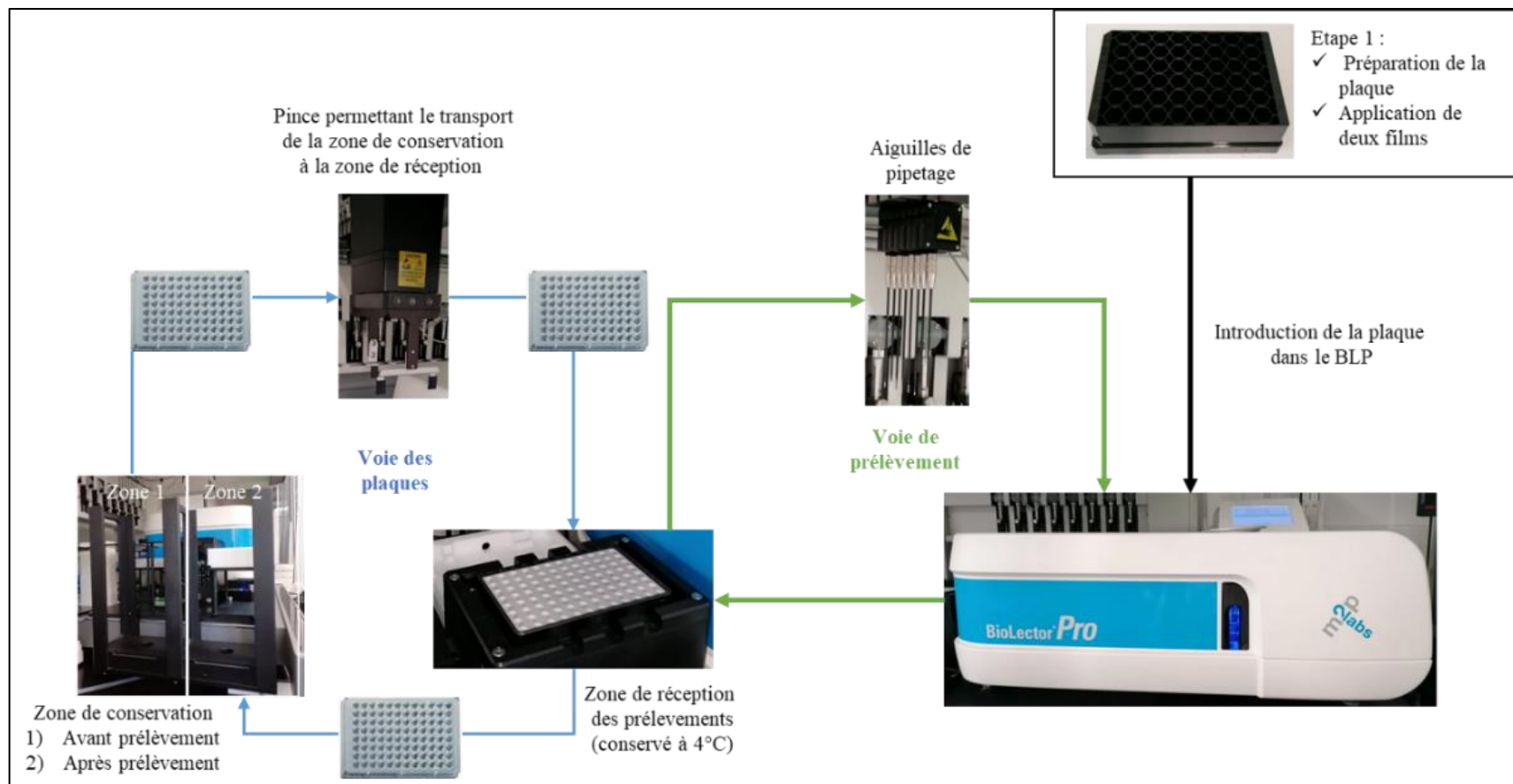


Figure 60 : Illustration du circuit effectué par le BLP pour le criblage de catalyseur d'oxydation en phase liquide pour la conversion du HMFA en AMFC.

Afin de mettre au point ce nouveau criblage, plusieurs problèmes ont dû être au préalable résolus, comme la méthode de prélèvement des échantillons. En effet, les aiguilles présentes sur le robot de pipetage n'étaient initialement pas prévues pour venir prélever dans un milieu contenant un catalyseur hétérogène en suspension. De ce fait des grains de catalyseurs pouvaient boucher ces dernières et fausser le volume prélevé. Après plusieurs essais, un temps de décantation de 3 min s'est révélé suffisant pour permettre aux catalyseurs chimiques de se déposer au fond des puits et ainsi de ne pas gêner les prélèvements. Nous avons également constaté qu'une agitation trop importante faisait déborder le milieu réactionnel et venait imbiber les films positionnés sur la plaque 48 puits. Un maximum de 400 rpm est apparu comme idéal éviter ce débordement. Notons que ce second problème n'est apparu qu'avec une seule des deux plaques à notre disposition. En effet, le BioLector Pro est en mesure d'utiliser deux types de plaques différents : les round-plates (RP) et les flower-plates (FP) représentées en Figure 61.

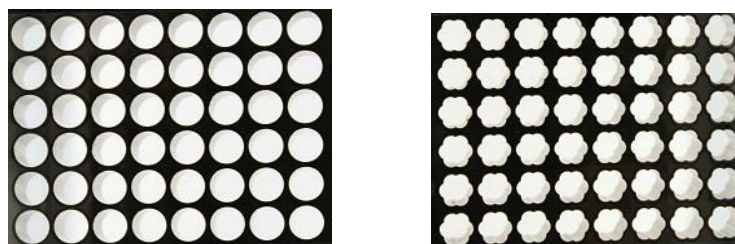


Figure 61 : Illustration d'une Round-plate (RP, gauche) et d'une Flower-plate (FP, droite).

Les premières sont assez classiques, alors que les secondes, avec leur puits en forme de fleur, sont en mesure d'augmenter le taux de transfert d'oxygène depuis la phase gaz pour une même vitesse d'agitation. Un premier essai a tout de même été réalisé en premier lieu avec les plaques à puits ronds. Cependant après 24 h de réactions, comme nous le craignons, aucune conversion du HMFA n'avait été observée. Un second essai a donc été réalisé en utilisant cette fois les puits en forme de fleur. Cette fois, la structure particulière des puits semble avoir effectivement offert une oxygénation du milieu suffisante, mais aussi sûrement une meilleure homogénéisation de ce dernier, le dépôt des nanoparticules sur les parois en fin d'expérimentation étant moins important. Ceci confirme l'intérêt du Biolector Pro et de ses plaques par rapport à un système de criblage en plaques classique. Ajoutons que les conversions observées au bout de 24 h de réaction se sont révélées similaires à celles du criblage observé en vials, bien qu'en général légèrement inférieur dans le cas du BLP. Les conditions finales retenues pour l'incubation sont présentées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Conditions retenues pour le criblage des catalyseurs d'oxydation sur le HMFA effectué au BLP.

Agitation	Température	Plaque	Temps	Repos avant prélèvement	Volume pipeté
400 rpm	50 °C	FP	48 h	180 min	30 µl

Le programme utilisé au BLP est disponible en annexe C (Figure 105).

6.2.1 Résultats du criblage pour la conversion du HMFA

La mise au point de cette méthode haut débit, qui a été utilisée à la fois pour le criblage de catalyseurs hétérogènes sur le HMFA et pour la mise au point de conditions 1P1S (résultats présentés dans le chapitre suivant) nous a permis de réaliser l'étude complète désirée en seulement 3 mois de travail effectif avec environ 300 réactions criblées en 10 jours. Pour comparer, en utilisant l'agitateur rotatif orbital et les vials scellés, la mise au point de la réaction 1P2S nous avait pris environ une année pour un nombre de tests nettement inférieur (environ une centaine).

6.2.1.1 Validation de la méthode au BLP

Le Tableau 16 présente la comparaison (rendement de conversion du HMFA et rendement en AMFC) entre le criblage manuel et le criblage automatisé des catalyseurs (BLP). Avec une différence moyenne de 7 % au niveau de la conversion du HMFA et de 5 % en AMFC produit (basée seulement sur les catalyseurs ayant produit de l'AMFC), les résultats obtenus entre le criblage manuel et le criblage automatisé se sont donc bien montrés comparables. De plus, là aussi, les meilleurs catalyseurs détectés lors du premier criblage se sont montrés les plus prometteurs, validant nos résultats précédents. L'exception de l' Au@CeO_2 peut-être tout de même être mise en avant, dans la mesure où cette fois, seuls 4,2 % d'AMFC ont été produits. Cela dit, le criblage n'ayant pas été répété, il est possible qu'il s'agisse d'une erreur de manipulation dans le cas présent.

Tableau 16 : Conversion du HMFA mesurée par HPLC-DAD après 48 h d'oxydation au BLP et en vials.

Entrée	Code du catalyseur	% de conversion du HMFA			% d'AMFC		
		Vial	BLP	Différence	Vial	BLP	Différence
1	C1	0	0	0	-	-	-
2	C3	7,3	9,2	1,9	1,4	1	0,1
3	C4	100	97	3	50,9	41,3	9,6
4	C5	36,8	25,3	11,5	-	-	-
5	C8	26,2	9	17,2	-	-	-
6	C10	19	28,5	9,5	-	-	-
7	C12	37,8	21,6	16,2	-	-	-
8	C13	9,7	6,2	3,5	-	-	-
9	C14	19,23	14	5,23	-	-	-
10	C15	23,74	21	2,74	-	-	-
11	C16	13	5,6	7,4	-	-	-
12	C18	1,66	3,6	1,94	-	-	-
13	C19	36,42	38,67	2,25	-	-	-
14	C20	14,89	29,16	14,27	-	-	-
15	C21	28,25	33,9	5,65	-	-	-
16	C22	66,59	43,51	23,08	15,8	4,2	11,6
17	C23	5,07	14,29	9,22	-	-	-
18	C24	67,88	76,1	8,22	51	39,9	11,1
19	C26	3,01	3,28	0,27	-	-	-
20	C27	2,88	2,04	0,84	-	-	-
21	C28	13,7	6,95	6,75	-	-	-
22	C29	69	71,8	3,14	9,1	6,8	2,3
23	C30	25,7	31,3	5,6	-	-	-
24	C31	87,4	84,1	1,37	79	84,4	5,4
25	C32	25,63	27	13,3	11,4	7,2	4,2
26	C33	6,5	17,5	11	-	-	-

27	C34	21,2	12,4	8,8	-	-	-
28	C35	89	73,4	16,5	4,8	4,2	0,6
29	C36	17,8	29	11,2	-	-	-
30	C37	22,6	19,8	2,8	3,5	7	3,5
31	C38	-	-	-	-	-	-
32	Au NPs	0	0	0	0	0	0

A l'inverse, Au@TiO₂ s'est de nouveau révélé très efficace, avec un rendement en AMFC produit meilleur de 5 %, et surtout l'absence dans ces conditions de sous-produits d'oxydation, presque tout le HMFA converti ayant été transformé en AMFC. Notons pour finir que les résultats obtenus avec le Au@CaO sont à comparer avec précaution à cause de l'existence du phénomène de polymérisation supposé, qui était difficilement contrôlable ici. Concernant les autres catalyseurs, il est intéressant de remarquer que, comme précédemment, certains d'entre eux, à l'instar du C35 par exemple, présentaient une bonne activité sur le HMFA (73 % dans le cas de ce dernier) sans pour autant produire d'AMFC (4 %). Ceci concorde d'ailleurs avec la nature de certains de ces catalyseurs, comme le C35 justement, qui est un au palladium immobilisé sur TiO₂, et qui toujours d'après la littérature favorise généralement la production du carbonyle sur celle de l'acide. La même observation peut également être faite concernant le C29 (Tableau 16, entrée 22) où une conversion d'environ 70 % du HMFA est observée pour environ 10 % d'AMFC formés dans le milieu réactionnel après 48 h de réaction. Ces catalyseurs pourront alors se révéler intéressants dans le cas où nous aimerions réaliser la production d'AMFA à la place de l'AMFC, travaux qui n'ont pas été menés durant cette thèse, mais qui seront réalisés dans la continuité du projet.

Il convient de préciser également que nous avons profité de ce second criblage pour évaluer la capacité d'oxydation des nanoparticules d'or seules, sans support, notamment dans l'optique de confirmer l'activité de celles immobilisées sur l'UiO-66-NH₂ (C24). Heureusement, avec ces dernières, aucune conversion du HMFA n'a été observée. Ces résultats nous ont donc confirmé que l'oxydation du HMFA par le C24 était bien due au catalyseur en lui-même et non au relargage des nanoparticules dans le milieu.

Suite à ces résultats encourageants, nous nous sommes alors demandés si nous pouvions augmenter la production d'AMFC en ajoutant un oxydant chimique comme évoqué

précédemment. Ainsi, le H₂O₂ et le KMnO₄ (0,5 mM chacun) été criblés avec les 32 catalyseurs dans les mêmes conditions que précédemment.

6.2.1.2 Criblage de catalyseurs au BLP en présence d'un oxydant

Le Tableau 17 présente les rendements de conversion obtenus lors du criblage avec l'ajout de 0,5 mM d'H₂O₂ ou de KMnO₄. Si les résultats varient assez d'un catalyseur à l'autre, les 4 meilleurs précédemment sélectionnés n'ont pas vu leur activité vis-à-vis du HMFA augmenter de manière significative en présence de l'un des deux oxydants. Notons tout de même que le C24 (Au@UiO-66_NH₂) a tout de même vu sa sélectivité vis-à-vis de la formation de l'AMFC augmenter avec l'H₂O₂. Notons que cette absence de variation peut être due au fait que ce type d'oxydant n'intervienne pas dans le mécanisme catalytique (ce qui est probable), mais également que leur concentration ne s'est pas trouvée suffisante que pour avoir un effet détectable.

Tableau 17 : Conversion du HMFA et rendement d'obtention de l'AMFC mesuré par HPLC-DAD après 48 h d'oxydation au BLP avec 0,5 mM de H₂O₂ et KMnO₄.

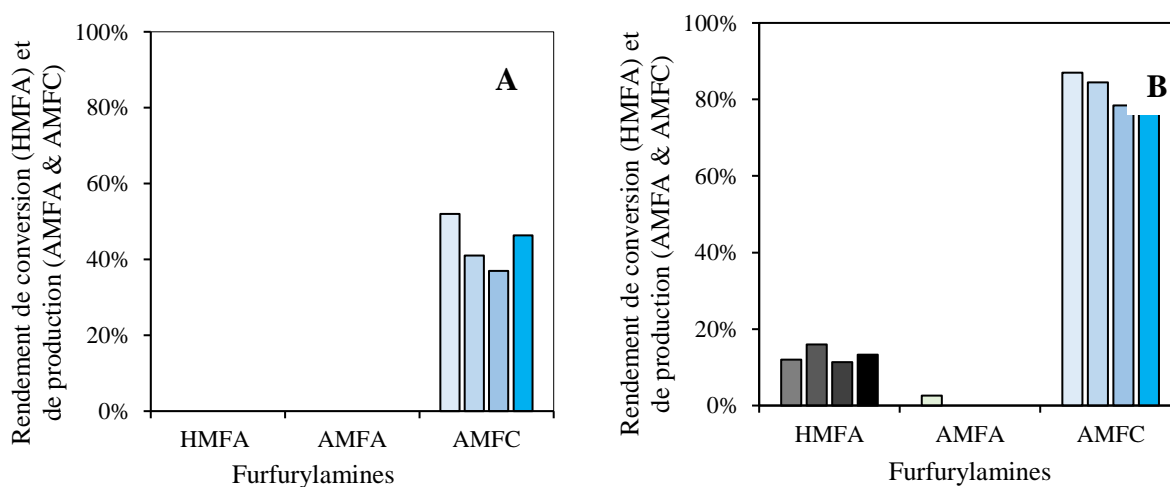
Entrée	Code catalyseur	Oxydant			Oxydant		
		Air	H ₂ O ₂	KMnO ₄	Air	H ₂ O ₂	KMnO ₄
		% de conversion du HMFA			Sélectivité envers l'AMFC (%)		
1	C1	0	3,66	4,25	-	-	-
2	C3	9,2	23,9	27,72	1	1,2	0,3
3	C4	97	100	92,15	41,3	37,4	46,3
4	C5	25,3	31,6	18,28	-	-	-
5	C8	9	3,32	6,98	-	-	-
6	C10	28,5	31,1	31,87	-	-	-
7	C12	21,6	9,66	31,3	-	-	-
8	C13	6,2	13,7	8,44	-	-	-
9	C14	14	4,87	3,76	-	-	-
10	C15	21	3,67	4,03	-	-	-
11	C16	5,6	8,51	11,15	-	-	-
12	C18	3,6	4,65	8,47	-	-	-

13	C19	38,67	22,02	14,24	-	-	-
14	C20	29,16	0,73	11,74	-	-	-
15	C21	33,9	30,3	18,23	-	-	-
16	C22	43,51	39,76	44,76	4,2	8	21,6
17	C23	14,29	4,61	13,72	-	-	-
18	C24	76,1	57,22	38,41	39,9	46,2	26,9
19	C26	3,28	11,52	8,27	-	-	-
20	C27	2,04	3,64	12,35	-	-	-
21	C28	6,95	16,09	18,58	-	-	-
22	C29	71,8	68,6	71,7	6,8	3,7	8,3
23	C30	31,3	63,4	66,6	-	0	0
24	C31	84,1	88,7	86,8	84,4	78	81,9
25	C32	27	85,8	86,4	7,2	8,6	7
26	C33	17,5	93	100	-	-	-
27	C34	12,4	20,7	6,1	-	-	-
28	C35	73,4	73,4	74,9	4,2	5,5	8,6
29	C36	29	28,8	30	-	-	-
30	C37	19,8	38,4	46,4	7	5	8,3
31	C38	-	-	-	-	-	-
32	Au NPs	-	-	-	-	-	-

6.2.1.3 Étude détaillée des capacités catalytiques des meilleurs catalyseurs

Les quatre catalyseurs ayant présenté les meilleurs résultats ont ensuite été comparés en détail pour leur capacité à convertir l'HMFA en AMFC, mais également en AMFA. La Figure 62 compare ainsi les différentes concentrations des furfurylamines dans les milieux réactionnels après 48 h d'oxydation réalisés en vials et au BLP, en incluant également les résultats obtenus en présence des oxydants chimiques. Il est important de préciser que le calcul du rendement en AMFA était basé sur une analyse semi-quantitative car nous n'avons pas réussi à le purifier.

Si l'on s'attarde donc sur les résultats obtenus pour ces 4 catalyseurs, on peut noter qu'avec le Au@CaO (C4) on réalise bien 100 % de conversion du HMFA en 48 h quelle que soit la condition réactionnelle étudiée. Comme précisé précédemment, aucune trace d'AMFA n'est également observée avec ce catalyseur, et de la même manière, le rendement en AMFC à 48h se situe en moyenne autour des 44 %, ce qui est très prometteur. Rappelons également que la formation d'un précipité est observée, à chaque fois, et que ce rendement devrait pouvoir être amélioré en contrôlant finement la cinétique de la réaction. Dans le cas du catalyseur Au@TiO₂ (C31), les quatre criblages donnent le meilleur rendement final en AMFC, situé entre 82 % à 87 %, ce malgré la présence d'HMFA résiduel. Cela dit, comme le Au@CaO, presque aucune trace d'AMFA n'est observée avec ce catalyseur, et il s'avère donc également très prometteur pour la mise au point du procédé en 1P1S. Concernant le catalyseur Au@UiO-66-NH₂ (C24) une certaine homogénéité entre les conditions réactionnelles testées est également observée, à l'exception du celle utilisant du KMnO₄ comme oxydant, ou la conversion du HMFA et le rendement en AMFC se sont trouvés nettement inférieurs à ceux des autres conditions. Cependant, ces résultats ne sont pas suffisamment significatifs que pour que nous puissions effectivement conclure quant au rôle de l'oxydant dans cette perte d'activité. Cela dit, avec un rendement en AMFC proche des 50 % dans les autres conditions, ce catalyseur a lui aussi été fortement considéré pour la mise au point de la 1P1S. Le Au@CeO₂ enfin, s'est montré comme décrit plus tôt, globalement moins efficace que les 3 premiers, avec une production en AMFA nettement supérieure à celle en AMFC. Notons également que celui-ci ne s'est pas révélé être le plus efficace pour la production de cet intermédiaire, les catalyseurs au palladium évoqués plus tôt s'avérant ici encore plus prometteurs pour cette synthèse alternative.



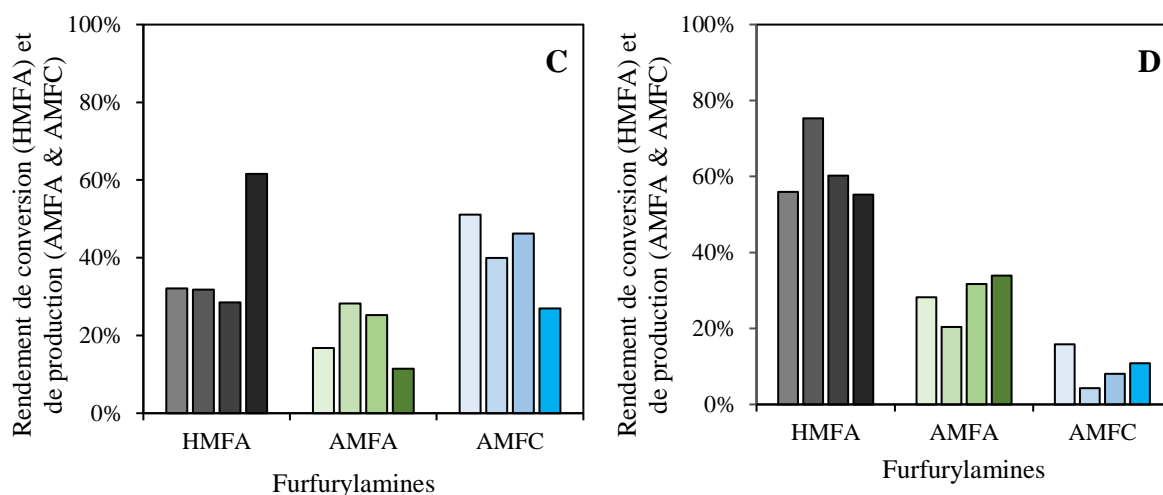


Figure 62 : Rendement de production des furfurylamines après 48 h d'oxydation du HMFA réalisés en vials (HMFA ■, AMFA □, et AMFC □), au BLP (HMFA ■, AMFA □, et AMFC □), au BLP + 0,5 mM de H₂O₂ (HMFA ■, AMFA □, et AMFC □), BLP + 0,5 mM de KMnO₄ (HMFA ■, AMFA □, et AMFC □) pour le catalyseur Au@CaO (A) Au@TiO₂ (B), Au@UiO-66-NH₂ (C), et Au@CeO₂ (D).

7 Conclusion

Malgré cela, au travers des différents criblages effectués au cours de ce chapitre, quatre catalyseurs (Au@CaO (C4), Au@CeO₂ (C22), Au@UiO-66-NH₂ (C24) et Au@TiO₂ (C31)) ont montré leur efficacité pour l'oxydation du HMFA en AMFC sans induire de mécanisme de désamination oxydative. Ils ont été sélectionnés pour la suite de ma thèse, avec comme objectif premier la mise en œuvre d'un procédé hybride de type 1P1S pour la production de l'AMFC. L'ajout d'un oxydant chimique n'a en revanche pas permis d'augmenter les rendements en produit, contrairement à ce qui était espéré. Concluons également sur le fait que, malgré quelques légères variations observées au niveau de rendements, notre nouvelle approche de criblage de catalyseurs chimique s'est avérée efficace dans le cas de l'oxydation du HMFA, avec des résultats très comparables à ceux obtenus en vials. Cette méthode représente, à notre connaissance, la première jamais mise au point grâce à l'utilisation du BioLectorPro[®] pour des catalyseurs chimiques, et fera donc l'objet d'une publication dédiée. Une fois ces 4 catalyseurs sélectionnés, nous nous sommes donc tournés vers le criblage des conditions réactionnelles pour la mise au point de notre 1P1S en utilisant à nouveau notre méthode robotisée basée sur le BioLector Pro[®]. Les résultats associés feront l'objet du prochain chapitre.

Chapitre 4 : Mise en œuvre d'un procédé hybride « one-pot/one-step » pour la formation d'acide 5-amino 2-furanoïque (AMFC) à partir du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF)

1 Mise en place du procédé hybride 1P1S avec le Biolector Pro®

Comme décrit dans le précédent chapitre, nous avons mis au point une nouvelle méthodologie de criblage automatisée, basée sur l'utilisation du BioLector Pro, permettant de tester des catalyseurs hétérogènes (solides) à 50 °C, tout en réalisant des prélèvements à intervalle régulier. Aussi nous avons décidé de l'utiliser de nouveau pour la mise au point des paramètres de notre réaction en 1P1S, afin de pouvoir en explorer un nombre plus important. Pour rappel, la réaction que nous visions dans ce chapitre est celle décrite dans le Schéma 20.

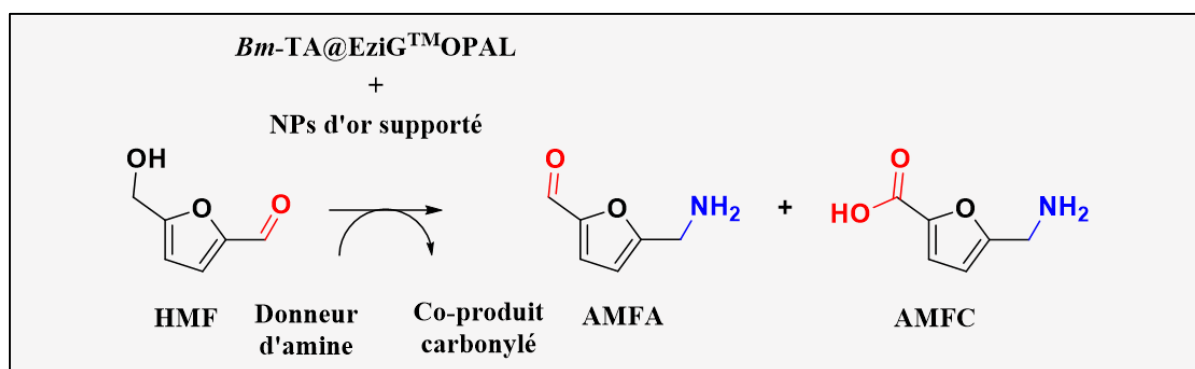


Schéma 20 : Système catalytique hybride 1P1S étudié pour la formation de furfurylamines à partir de HMF.

En nous basant sur nos résultats précédents, nous avons montré que la conversion complète du HMF en HMFA était possible en seulement quelques heures, avec une quantité d'enzyme minimal, grâce à sa forte activité envers ce substrat. Nous avons de fait supposé que l'étape limitante du procédé hybride serait la réaction d'oxydation, réalisée par le catalyseur chimique hétérogène. L'enjeu de cette partie de l'étude était donc de 1) étudier la capacité des deux catalyseurs à cohabiter dans le même milieu réactionnel et 2) trouver la bonne proportion entre les deux de manière à économiser l'enzyme au maximum, tout en maintenant une bonne vitesse pour l'oxydation chimique. Ce faisant, nous avons utilisé comme paramètres initiaux à croiser quatre quantités de catalyseurs chimiques (1, 2, 4 et 8 mg) et trois quantités d'enzyme (200, 400 et 600 µg) immobilisées sur le support OPAL en respectant le ratio 1/5 (g/g), soit 1, 2 et 3 mg de support OPAL. Ainsi 12 combinaisons de catalyseurs ont été testées, et ce pour chacun de catalyseurs chimiques sélectionnés. A ce propos, en accord avec les conclusions précédentes, les quatre catalyseurs sélectionnés pour cette étude étaient donc le Au@CaO (C4), le Au@CeO₂ (C22), le Au@UiO-66-NH₂ (C24) et le Au@TiO₂ (C31). Nous avons constaté dans le chapitre précédent que l'immobilisation enzymatique ne permettait pas d'améliorer la

stabilité thermique de la *Bm*-TA. Cependant, cette dernière a tout de même démontré sa capacité à convertir la totalité du HMF en HMFA en quelques heures. Une immobilisation est donc sélectionnée afin de parer à tout empoisonnement croisé entre catalyseurs lors des réactions hybrides 1P1S.

Le Tableau 18 résume la nomenclature utilisée pour les différentes combinaisons testées ici. Celle-ci se décompose de la façon suivante : « **Hyb_{x(C)-n}** » est utilisé pour nommer chaque condition, où « n » définit la quantité de supports enzymatiques, et donc par extension la quantité d'enzymes immobilisées, et où « x » définit directement la quantité de catalyseurs chimiques introduite. Le sigle « (C) » définit quant à lui le code du catalyseur utilisé dans la réaction hybride.

Tableau 18 : Définition de la nomenclature du procédé hybride 1P1S mis en œuvre avec le BLP.

<i>Bm</i> -TA (μg)	Support (mg)	Quantité de catalyseurs (mg)			
		1	2	4	8
200	1	Hyb _{1(C)-1}	Hyb _{2(C)-1}	Hyb _{4(C)-1}	Hyb _{8(C)-1}
400	2	Hyb _{1(C)-2}	Hyb _{2(C)-2}	Hyb _{4(C)-2}	Hyb _{8(C)-2}
600	3	Hyb _{1(C)-3}	Hyb _{2(C)-3}	Hyb _{4(C)-3}	Hyb _{8(C)-3}

1.1 Procédé hybride combinant la *Bm*-TA@EziGTMOPAL et Au@CeO₂

Concernant les résultats obtenus, nous commencerons par vous présenter ceux qui se sont révélés les moins prometteurs, avant de nous tourner vers les réactions qui ont le mieux fonctionné. Ainsi, comme planifié d'après les criblages précédents, le catalyseur Au@CeO₂ s'est révélé être le moins performant. Pour rappel, ce dernier avait montré des rendements en oxydation du HMFA allant jusqu'à 16 % en AMFC au maximum, avec une conversion d'environ 40 % du substrat en 48 h de réaction. Parmi les 12 conditions testées ici pour la 1P1S avec ce catalyseur, aucune formation d'AMFC supérieure à 5 % n'est observée, quel que soit le rapport en catalyseur mis en œuvre, alors que la conversion du HMF varie elle entre 80 et 95 % comme espérer avec l'enzyme, avec une production équivalente en HMFA.

Compte tenu des résultats ici obtenus, nous observons une diminution importante de l'efficacité du catalyseur Au@CeO₂ lorsqu'il est mis en présence directe de la *Bm*-

TA@EziGTMOPAL et du donneur d'amine. Le comportement de la *Bm*-TA@EziGTMOPAL était quant à lui légèrement impacté par la présence du catalyseur chimique avec une conversion du HMF en HMFA légèrement incomplète, là où les blancs sans catalyseur chimique ont montré une conversion totale en 48 h de réaction. La quantité d'enzyme minimale à introduire en réaction pour réaliser cette conversion a donc pu être définie à 200 µg (sur 1 mg de support OPAL (Hyb_{x(c)-1})) dans les présentes conditions. Ceci est corrélé avec le fait que plus la quantité en Au@CeO₂ augmente, plus la conversion du HMF décroît. Effectivement en présence de 8 mg de catalyseurs (Hyb_{8(C22)-1}), la conversion du HMF tombe à 80 % contre 95 % en présence de seulement 1 mg (Hyb_{1(C22)-1}) de catalyseur chimique dans le milieu réactionnel, démontrant l'influence directe de ce dernier. En revanche, les faibles quantités d'AMFC formées (inférieures à 5 %) ont quant à elles été détectées seulement à partir de 4 mg en catalyseur chimique dans le milieu réactionnel.

Dans ces conditions, l'étape limitante de la 1P1S était très clairement l'oxydation chimique, bien que ce ne soit pas étonnant au vu de la faible efficacité du catalyseur mesurée dès les précédents criblages. Cela dit, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour tenter d'expliquer cette perte d'activité entre les deux conditions de criblage. En effet, dans le cas de la 1P1S, l'enzyme est non seulement introduite dès le début de la réaction avec le catalyseur chimique, mais c'est également le cas du co-substrat (ici la (*S*)-MBA) qui peut également venir empoisonner le métal. Cette hypothèse est d'ailleurs étayée par le travail de Murzin *et al.*¹⁹¹ qui ont travaillé sur l'amination du myrténol, un autre substrat bio-sourcé, au travers de l'utilisation de nanoparticules d'or supportées sur un panel de supports oxydés. De manière intéressante, cette réaction passait d'abord par l'oxydation de l'alcool en cétone, puis par sa conversion en imine puis enfin en amine, les trois étapes devant être catalysées par le même métal supporté. Ce que les auteurs ont alors pu constater est que la présence de sites acides sur le support du métal favorisait l'accumulation des fonctions amines à sa surface. Ainsi, dans le cas de notre réaction, une telle accumulation pourrait également avoir conduit à une inactivation de ce dernier. De plus, l'analyse BET a montré que ce catalyseur en particulier possédait une faible surface spécifique (10 m². g⁻¹). Dès lors, il est probable qu'il soit plus sensible à ce type d'inhibition. Un test d'oxydation du HMFA en présence d'une quantité d'amines (donneur utilisé pour la synthèse) variable sera ainsi nécessaire afin d'étayer cette hypothèse.

1.2 Procédé hybride combinant la *Bm-TA@EziGTMOPAL* et *Au@CaO*

Le catalyseur *Au@CaO* a quant à lui montré une conversion complète HMFA comme nous pouvions l'attendre (Figure 63). Cependant, comme précédemment, le rendement en AMFC n'a pas dépassé les 45 %, et le bilan carbone s'est révélé incorrect, traduisant la formation du précipité brun que nous avons une fois de plus pu observer à l'issue de la réaction. Comme nous n'avons pas réussi à isoler l'AMFA et à le quantifier, ce dernier est représenté sous forme barrée rouge dans les cinétiques.

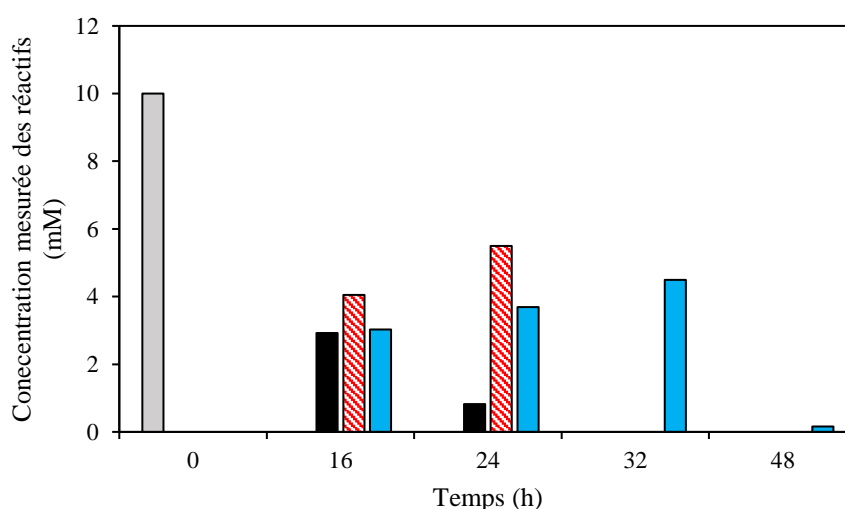


Figure 63 : Evolution de la concentration des produits réactionnels (HMF , HMFA , AMFA , et AMFC) au cours du temps dans le procédé hybride effectué avec le BLP et combinant le catalyseur *Au@CaO* et la *Bm-TA@EziGTMOPAL* pour la réaction $\text{Hyb}_{8(\text{C}_4)}-1$. Les prélèvements ont été analysés après 16, 24, 32 et 48 h par HPLC-DAD à 210 (HMFA), 245 (AMFC) et 280 (HMF).

Malgré cela il s'agit d'un résultat très prometteur, car, en contrôlant mieux la cinétique entre 24 h et 32 h de réactions, nous devrions pouvoir augmenter ce rendement. Si l'on étudie plus précisément la cinétique observée justement, on s'aperçoit tout d'abord que le HMF est entièrement converti en 16 h de réaction, comme escompté, ce qui traduit le fait que cette fois, l'enzyme ne semble pas impactée par ce catalyseur. Notons que l'ensemble de la conversion semble bien être faite en HMFA puisqu'aucun autre produit (d'oxydation) n'est effectivement détecté après 16h en HPLC. La concentration de dernier décroît d'ailleurs également de manière très rapide dès qu'il est formé, avec seulement 29 % restant à 16h de réaction, pour déjà 40 % d'AMFA et 30 % d'AMFC. L'AMFC augmente quant à lui bien lentement mais sûrement pour passer de 30 % dès 16h de réaction, à 45 % après 24h, puis 45 % à 32 h. Évidemment, il est fort

probable que cette concentration soit fortement minorée tout au long de la réaction par la formation concomitante du précipité. Cependant, à 48 h, ce dernier n'est plus qu'à 5 %. L'AMFC est donc bien consommé entre 32 h et 48 h, et si polymère il y a il en est bien l'un des synthons constitutifs. Cependant, compte tenu de la réactivité probablement encore plus importante de la fonction aldéhyde de l'AMFA, il est également probable que celui-ci intervienne également dans la polymérisation, même s'il est difficile de le vérifier dans l'état actuel des choses. On pourrait alors également imaginer une attaque nucléophile des fonctions amines des différents synthons en présence (dont le HMFA) sur la fonction aldéhyde de l'AMFA. Si ce mécanisme s'avère véridique, la continuité de ce projet pourrait mener à la mise au point d'un nouveau polyimine composé de plusieurs monomères, dont la composition pourrait alors peut-être être modulée, afin notamment de lui conférer des propriétés mécaniques différentes. Notons également, qu'au vu du fait que seul ce catalyseur chimique semble produire un tel précipité, il est presque certain que ce soit le support de ce dernier qui joue un rôle prépondérant dans cette polymérisation. Ceci concorde avec le fait que ce dernier possède des sites actifs basiques qui pourraient effectivement favoriser ce type de réactions entre les amines et fonctions carbonyle/acide des molécules présentes dans le milieu réactionnel.

Afin d'essayer d'éclaircir ce phénomène, plusieurs analyses ont été tentées sur le résidu formé, après sa collecte et son lavage en fin de réaction. Cependant, les différentes RMN des liquides effectuées n'ont pas encore permis d'élucider sa structure malgré une solubilité dans le DMSO-D₆. L'hydrophobicité du potentiel polymère obtenu a été confirmé par notre incapacité à le solubiliser dans le solvant D₂O pour des analyses RMN. Cela nous laisse donc bien suggéré un enchaînement de cycle furane avec des propriétés relativement hydrophobes.

Dans toutes les réactions hybrides, l'entièreté du HMF a été consommée pour donner du HMFA. Ce qui laisse supposer que l'enzyme est peut impacter par la présence du catalyseur chimique. De manière intéressante, la formation d'AMFC n'est détectée qu'à partir de l'introduction de 4 mg de catalyseurs dans le milieu réactionnel (Hyb_{(C4)4-1}, Hyb_{(C4)8-1} Hyb_{(C4)4-2}, Hyb_{(C4)8-2}, Hyb_{(C4)4-3}, Hyb_{(C4)8-3}, Figure 64).

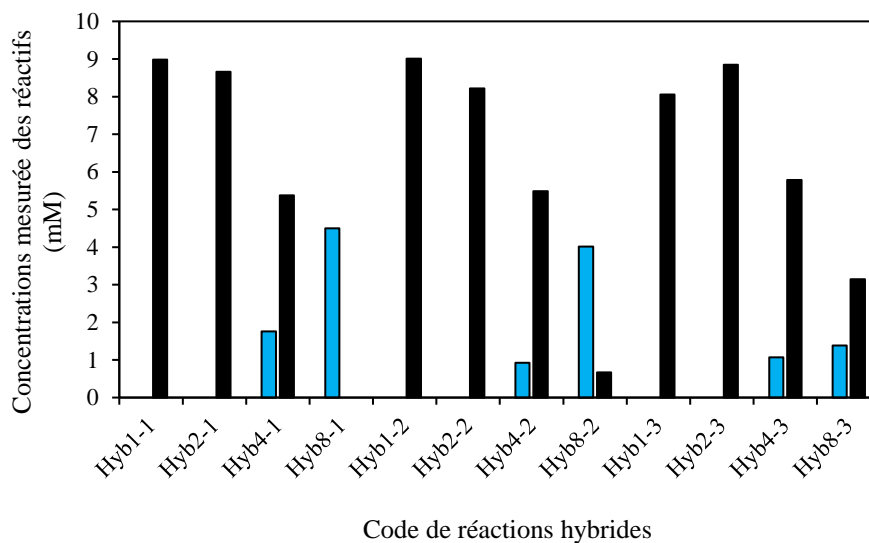


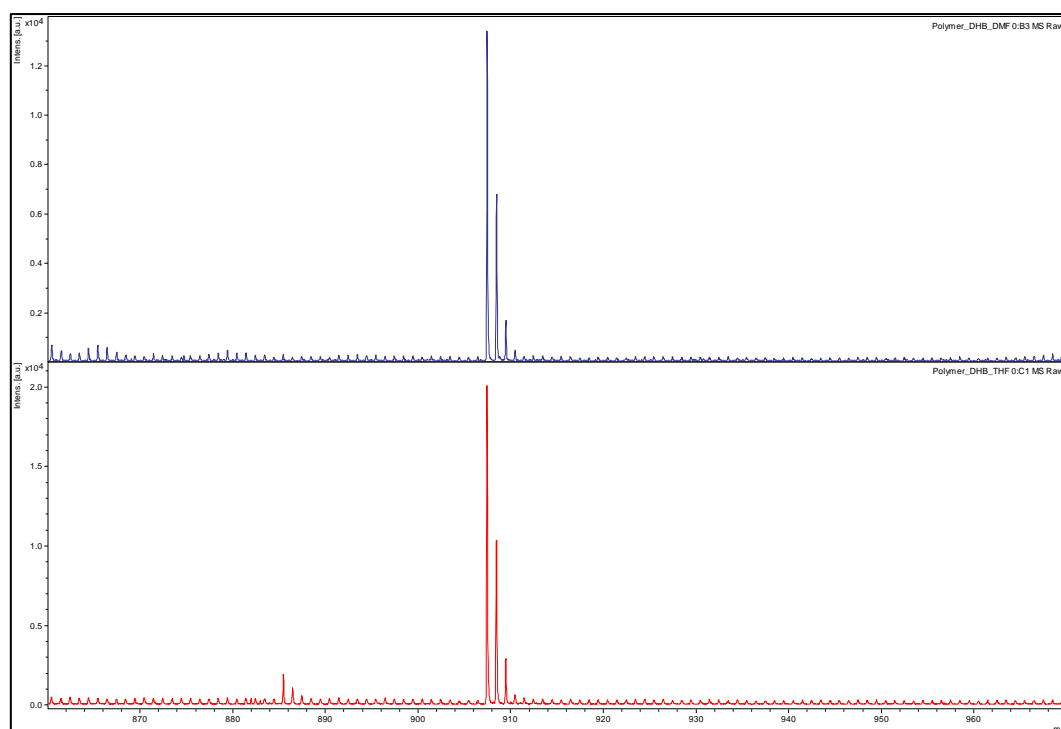
Figure 64 : Concentration mesurée en HPLC-DAD du HMFA (■) et de l'AMFC (■) à t32 h pour les 12 réactions hybrides combinant la *Bm*-TA immobilisée sur support OPAL et le catalyseur Au@CaO (C4).

De plus, nous pouvons constater une diminution de la concentration en AMFC avec l'augmentation de la quantité d'enzyme introduite. Seulement 10.6 % et 13.8 % d'AMFC sont formés dans les réactions Hyb_{(C4)4-3}, Hyb_{(C4)8-3} après 32 h contre 17.6 et 45 % dans les réactions Hyb_{(C4)4-1}, Hyb_{(C4)8-1} respectivement. Ces résultats sont corrélés avec l'observation d'un précipité brun plus « opaque » dans le cas des réactions Hyb_{(C4)4-1} et Hyb_{(C4)8-1}, ce qui laisse supposer une polymérisation plus efficace. Si on part de l'hypothèse que la polymérisation est induite par le catalyseur, on peut donc constater un effet support de l'enzyme qui diminue l'activité catalytique de ce dernier. Ainsi, afin de déterminer si la cause de l'inhibition est due au support ou à l'enzyme, une répétition des manipulations avec l'enzyme libre est nécessaire.

Concernant la détermination structurale du précipité brun, seule l'analyse en spectrométrie de masse MALDI-Tof a permis de mettre en évidence la présence de pics compris entre 908 et 910 Da (Figure 65). La masse molaire moyenne des différentes furfurylamines présente dans le milieu étant de 131 g.mol⁻¹ et si l'on suit l'hypothèse que les trois furfurylamines réagissent entre elles, cela nous donnerait un polymère composé d'environ 7 unités (Tableau 19). Cependant, nous ne sommes pas certains que ce type de calcul soit effectivement pertinent, et il sera donc de toute manière essentielle d'essayer d'analyser plus en détail le solide obtenu, notamment avec l'aide des polyméristes de l'UCCS.

Tableau 19 : Calcul du nombre d'unités supposé du polyimine formé.

Furfurylamine	HMFA	AMFA	AMFC
Masse molaire (g.mo ⁻¹)	127	125	141
Moyenne (g.mo ⁻¹)	131		
Nombre unité	$= \frac{\text{masse molaire totale}}{\text{moyenne masse molaire}}$ $= \frac{910}{131} = 6.94 \approx 7$		

**Figure 65** : Spectre MALDI-TOF du précipité brun récupéré après mise en œuvre du procédé hybride 1P1S combinant 8 mg d'Au@CaO et 200 µg de *Bm*-TA immobilisée sur 1 mg de support OPAL.

1.3 Procédé hybride combinant la *Bm-TA@EziGTMOPAL* et *Au@UiO-66-NH₂* ou *Au@TiO₂*

Concernant les deux autres catalyseurs chimiques, qui étaient les plus prometteurs, nous analyserons leurs résultats de manière simultanée. La Figure 66 représente ainsi le pourcentage d'AMFC mesuré dans les milieux réactionnels après 48 h de réaction.

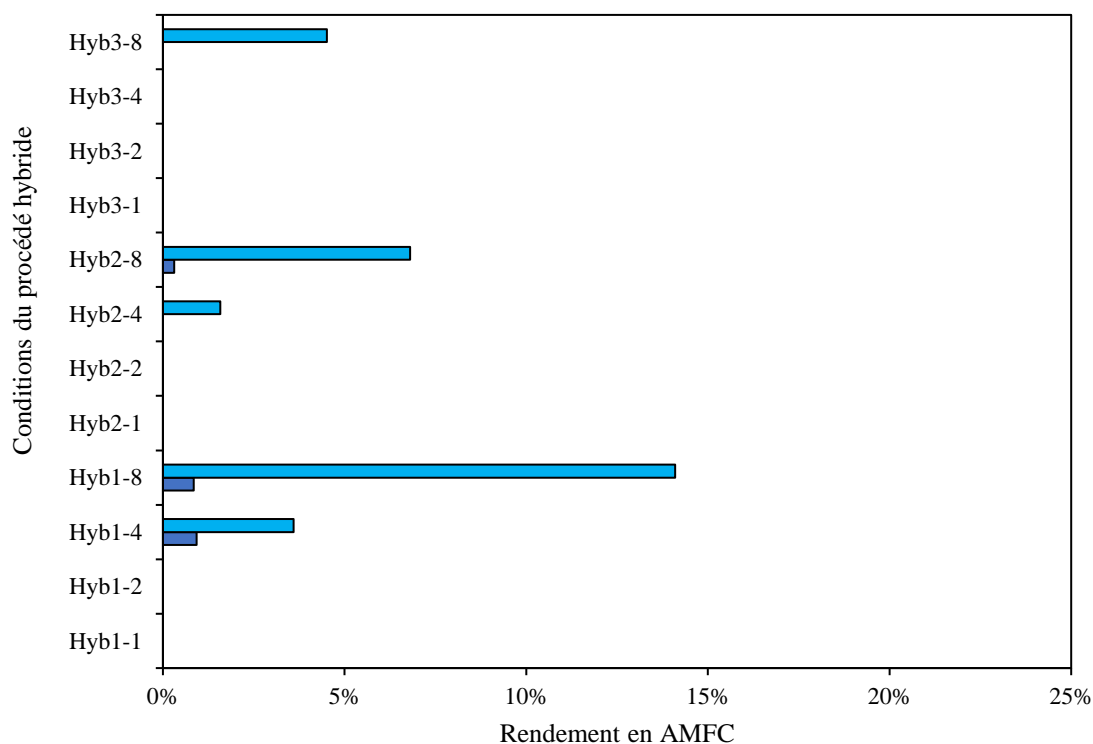


Figure 66 : Rendement en AMFC dans différents milieux réactionnels après 48 h de mise en œuvre du procédé hybride combinant des nanoparticules métalliques supportées (*Au@TiO₂* ■ et *Au@UiO-66-NH₂* ■) et une transaminase immobilisée (*Bm-TA@EziGTMOPAL*). Les concentrations sont mesurées par HPLC-DAD à 245 nm.

Concernant le catalyseur *Au@TiO₂*, qui avait permis d'obtenir un rendement d'environ 85 % en AMFC lors du criblage des catalyseurs chimiques, celui n'a pas montré d'activité réelle dans le cas de la 1P1S, quelle que soit la proportion en catalyseur. Effectivement des rendements inférieurs à 5 % en AMFC sont aux mieux observés après 48 h. Ceci peut très probablement s'expliquer par un empoisonnement de ce dernier par l'enzyme. En effet, les seules productions d'AMFC sont observées dans les milieux réactionnels réalisés avec les ratios enzyme/catalyseur chimique les plus faibles (*Hyb_{(C31)1-4}*, *Hyb_{(C31)1-8}*, et *Hyb_{(C31)2-8}*). D'autant que là encore, une conversion du HMF en HMFA allant de 80 % à 95 % suivant les conditions a pu être observée, montrant l'efficacité de l'enzyme. De manière intéressante, le *TiO₂* est

similaire au CeO_2 , il possède à la fois des sites actifs acides et basiques. Il est donc possible que ces derniers jouent là encore un rôle prépondérant dans l'inhibition. Le rendement supérieur en AMFC pour le TiO_2 peut être expliqué par une surface spécifique supérieure à celle du CeO_2 (environ $44 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ contre $10 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ pour le CeO_2). Ainsi, la plus grande surface spécifique permettrait de réduire l'impact des inhibitions pour le catalyseur Au@TiO_2 . De plus on peut constater que plus la quantité d'enzyme augmente, plus le rendement en AMFC diminue. Une hypothèse pouvant expliquer cela est un potentiel leaching de l'enzyme du support qui viendrait entraîner une inhibition du catalyseur chimique ou un effet du support directement entraînant des problèmes de diffusion du substrat à la surface du catalyseur. Afin d'étayer cette hypothèse, un test de Bradford directement sur le milieu réactionnel serait nécessaire afin de vérifier la quantité de protéine dans le milieu réactionnel.

A contrario, le catalyseur Au@UiO-66-NH_2 semble moins impacté par ce type d'inhibition. En effet, si les rendements en AMFC obtenus après 48 h demeurent inférieurs à ceux obtenus lors du criblage 14 % contre près de 50 % respectivement, ces résultats restent malgré tout prometteurs. De manière très intéressante, ici encore, on observe une corrélation inversement proportionnelle entre le ratio enzyme/catalyseur chimique et la production d'AMFC. Ainsi, à 200 μg d'enzyme, 4 et 8 mg de catalyseur chimique sont suffisants pour obtenir de l'AMFC, avec un rendement bien meilleur à 8 mg, là où la même tendance peut être observée pour 400 μg d'enzyme, mais avec des rendements inférieurs, et où, avec 600 μg d'enzyme en présence dans le puits, seule la condition à 8 mg d' Au@UiO-66-NH_2 a donné lieu à la production d'AMFC en 48 h. Cela pourrait alors peut-être être expliqué par la nature même du support qui, composé de ligands téréphtaliques, chélatant des clusters de Zr, ne présente à priori pas de sites acides ou basiques disponibles. Cette explication, additionnée à une surface spécifique importante ($726 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) pourrait expliquer l'activité catalytique supérieure. De la même manière, la présence du substituant amino sur le cycle benzénique du ligand ne favorise peut-être pas l'adsorption du donneur d'amine sur ce dernier. Ainsi, au final, c'est le catalyseur qui a donné les meilleurs résultats avec un rendement en AMFC d'environ 17 % dans le milieu réactionnel après 48 h (Figure 67).

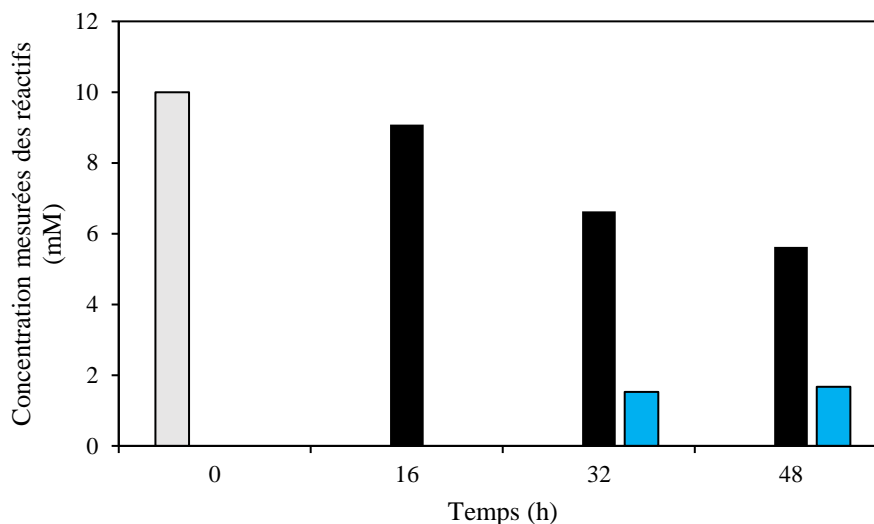


Figure 67 : Evolution de la concentration des produits réactionnels (HMF , HMFA , et AMFC) au cours du temps dans le procédé hybride effectué avec le BLP et combinant le catalyseur Au@CaO et la *Bm-TA@EziGTMOPAL* pour la réaction Hyb_{8(C24)}-1. Les prélèvements ont été analysés après 16h, 32 h et 48 h par HPLC-DAD à 210 (HMFA), 245 (AMFC) et 280 (AMFA) nm.

Ce rendement a été observé dans le cas du procédé Hyb_{8(C24)}-1. La cinétique de la réaction correspondant à cette condition est détaillée dans la Figure 67. Après 16 h, on peut noter que tout le HMF a été converti en HMFA, traduisant le fait que l'enzyme est toujours suffisamment en présence de ce catalyseur chimique. Notons que de faibles quantités d'AMFA peuvent déjà être détectées (non-représenté ici car non quantifié). Après 32 h de la réaction, une conversion d'environ 34 % du HMFA a pu être observée pour donner 15 % d'AMFC, et à 48 h, la concentration en AMFC est 18 %, avec 44 % de consommation du HMFA. L'autre produit correspond certainement à l'AMFA (pic en HPLC). Aussi, ces conditions semblent être une bonne première base pour la mise au point d'un procédé en 1P1S efficace. D'autant que comme nous l'avons évoqué précédemment, ce type de support, pourrait permettre une compartimentation des deux catalyseurs, et ainsi de limiter leur inhibition croisée.⁶²

Cependant, précisons que nous avons également constaté une dégradation du Au@UiO-66-NH₂, avec un phénomène de leaching des nanoparticules d'or dans le milieu réactionnel. Ce dernier est d'ailleurs sûrement en partie responsable du rendement modéré obtenu avec ce catalyseur chimique, et sa limitation devrait ainsi pouvoir représenter une piste d'amélioration prometteuse pour le procédé.

Tous les procédés hybrides mis en œuvre lors du criblage au BLP ont été effectués en immobilisant la *Bm*-TA. Aussi, afin de vérifier si le support OPAL ne serait pas également responsable d'une partie de l'inhibition de l'activité des catalyseurs chimiques, ces réactions ont été reproduites en testant cette fois également l'enzyme sous sa forme libre. Ajoutons que cette fois également, les tests ont été réalisés en vials, afin de nous rapprocher des conditions mises en œuvre pour les 1P2S, et de voir si une agitation rotative à la place d'orbitale ne permettait pas une meilleure conversion du HMFA en AMFC. Afin limiter le nombre d'expérimentations, seules les meilleures conditions obtenues lors du criblage au BLP ont été reprises et testées en vial. La conversion du HMF et la production d'AMFC à 48 h obtenues en résultat de ces expérimentations sont présentées dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Taux de conversion et rendement en AMFC pour la reproduction du procédé 1P1S en vial.

	<i>Bm</i> -TA libre (200 µg)		<i>Bm</i> -TA@EziG™OPAL	
Au@TiO₂	Conversion HMF	Rendement AMFC	Conversion HMF	Rendement AMFC
4 mg	75 %	4.2 %	92 %	3.1 %
8 mg	80 %	5.5 %	91 %	18 %
Au@UiO-66-NH₂	Conversion HMF	Rendement AMFC	Conversion HMF	Rendement AMFC
4 mg	71 %	7.5 %	63 %	7 %
8 mg	94 %	12 %	80 %	9 %

La première chose que nous pouvons constater à travers ces résultats, est que le fait de reproduire les procédés en vial n'a pas permis d'augmenter ni la conversion du HMF ni le rendement en AMFC, à part pour la condition avec 8 mg d'Au@TiO₂, et l'enzyme immobilisée. A titre d'exemple, si l'on s'intéresse à la condition qui avait donné le meilleur rendement en AMFC lors du criblage, utilisant 8 mg de catalyseur et l'enzyme immobilisée, seuls 9 %

d'AMFC peuvent être obtenus après 48 h. Aussi, si l'on cherche à expliquer la diminution de ces rendements, on peut tout d'abord remarquer qu'un taux de conversion compris entre 70 et 95 % du HMF est observé en fonction des conditions réactionnelles utilisées, traduisant une diminution globale de l'activité de la transaminase. La conversion du HMF en HMFA semble de plus être inférieure avec l'enzyme libre par rapport à l'enzyme immobilisée dans le cas du Au@TiO₂, ce qui pourrait démontrer un côté protecteur de l'immobilisation, peut-être contre l'action mécanique de ce dernier. Cependant de manière surprenante, avec le Au@UiO-66-NH₂, ce phénomène est inversé, et qui plus est, dans les deux cas l'augmentation de la quantité en catalyseur chimique ne semble pas s'accompagner d'une diminution de l'activité de la transaminase. Aussi, il est difficile de réellement conclure quant au phénomène à l'œuvre ici, et la reproduction de ces expérimentations semble impérative. Notons qu'aucuns produits d'oxydations du HMF par le catalyseur chimique n'est détecté ici, ce qui aurait pu expliquer un tel comportement.

En revanche, de manière logique, plus la quantité en catalyseur chimique augmente, et plus le rendement en AMFC augmente. Cependant, là encore, avec 18 % d'AMFC produits lorsque l'on combine 8 mg d'Au@TiO₂ et 200 µg de *Bm*-TA immobilisée contre 3.1% avec l'introduction de 4 mg de catalyseurs. Les rendements inférieurs observés par rapport au criblage du HMFA peuvent potentiellement être expliqués par des problèmes de diffusion à la surface du catalyseur. Des manipulations supplémentaires en faisant varier la masse de catalyseur introduite dans le milieu réactionnel seraient nécessaire afin de d'étudier la conversion du HMFA en présence d'enzymes. Concernant le Au@UiO-66-NH₂, les rendements inférieurs pourraient être expliqués par des problèmes de diffusion du substrat à l'intérieur des pores du MOF. Effectivement ces derniers pourraient voir leur entrée se boucher par l'enzyme ou le support présent dans le milieu réactionnel.

De manière générale, ces derniers résultats ne permettent pas réellement de conclure quant à une tendance entre l'utilisation de l'enzyme libre et immobilisée, et il sera important de les reproduire afin de vérifier leur pertinence.

La conversion moindre observée avec l'enzyme libre peut être expliquée par une inhibition due aux NPs. L'introduction de l'enzyme libre dans le milieu réactionnel mène à des taux de conversion moins importante du HMF par rapport à l'enzyme immobilisée. Cela est intéressant étant donné que nous avons observé une stabilité thermique plus importante lorsque l'enzyme est libre que lorsqu'elle immobilisée. Il y a donc une inhibition de l'activité de

l'enzyme libre liée à la présence du catalyseur chimique. La Figure 68 représente la structure 3D de la B9AZ94 avec les acides aminés polaires en bleu.

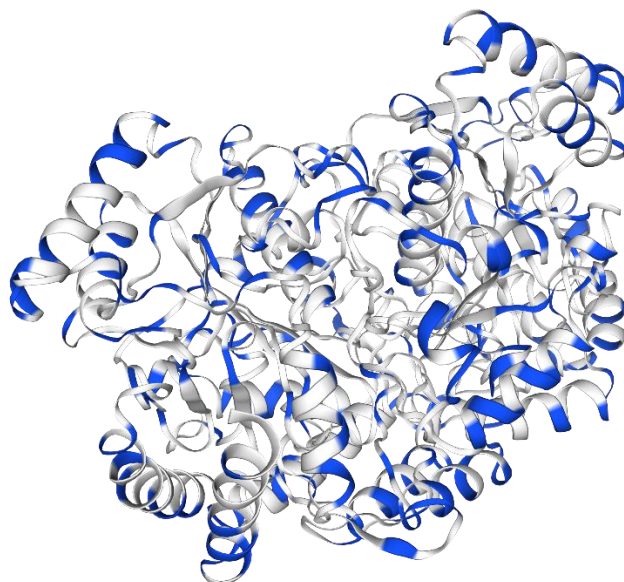


Figure 68 : Représentation de la structure 3D de la *Bm*-TA (Unipro Acess Number : B9AZ94) avec les acides aminés polaires représentés en bleu.

Nous voyons qu'une quantité importante d'acides aminés polaires est disposée en surface de la protéine. Le repliement différent de la protéine, lorsqu'elle est libre, permet peut-être à ces acides aminés de venir interagir avec le catalyseur et ainsi diminuer la conversion finale du HMF.

2 Conclusion

Un procédé hybride en 1P1S, permettant une production d'AMFC à partir de HMF, a pu être développé. Dans le meilleur des cas, nous avons pu obtenir 45 % de rendement en AMFC au bout de 32 h de réaction, avec le Au@CaO (C4) comme catalyseur chimique. Il est important tout de même de préciser que ce rendement diminue fortement entre 32 h et 48 h, avec une consommation de l'AMFC par le catalyseur, et que de manière générale, une réaction parasite, probablement de polymérisation, vient diminuer le rendement en furfurylamine obtenues tout au long du procédé. Concernant les deux autres catalyseurs chimiques les plus prometteurs (Au@TiO₂ et Au@UiO-66-NH₂), nous avons obtenu une production finale en AMFC de 18 % (réaction en vial) et 17 % (réaction au BLP) respectivement. Bien que nous soyons loin des rendements obtenus avec la 1P2S, ces réactions présentent plusieurs pistes d'amélioration. Ainsi dans un premier temps, une diminution du leaching des nanoparticules d'or sur le UiO-66-NH₂ pourrait être envisagée, en changeant par exemple la méthode d'immobilisation utilisée pour la synthèse du catalyseur. D'autre part, l'ajout d'une pression d'air ou d'oxygène pourrait être envisagé pour l'étape d'oxydation. Cependant, ce type d'expérimentation n'est pas réalisable en vials et difficilement avec le BioLector, et la recherche d'un nouvel équipement pour ce type conditions semble être une étape prioritaire. Le réacteur SPR (proposé par REALCAT) semble une solution envisageable. Enfin, une nouvelle série de catalyseurs chimiques pourrait également être envisagée. La transaminase quant à elle a globalement montré une excellente efficacité pour la conversion du HMF en HMFA, quelles que soient les conditions mises en œuvre. L'immobilisation de cette dernière sur d'autres supports pourrait tout de même être envisagée, notamment de manière à la rendre encore moins sensible à la présence des catalyseurs chimiques, voire même d'envisager son recyclage.

Sur le plan technique, notons que nous avons su adapter le BioLector Pro pour le criblage de réactions d'oxydation en 1P1S avec des catalyseurs hétérogènes (solides) en phase liquide, et que ce système permet désormais un prélèvement automatique du milieu réactionnel toutes les 8 h. C'est notamment la mise au point de cette approche robotisée qui nous a permis de réaliser le procédé hybride en 1P1S durant le temps imparti pour cette thèse, avec environ un mois de travail effectif pour cette dernière. Pour comparaison en utilisant un système de criblage manuel, il nous a fallu environ un an de travail pour implémenter le procédé hybride 1P2S présenté dans le chapitre 2.

Pour finir, rappelons que cette réalisation représente la première réaction hybride en 1P1S française et nous espérons qu'elle pourra ouvrir la voie à de nombreux autres, en démontrant l'intérêt, mais aussi la faisabilité, de la combinaison de catalyseurs chimiques et biologiques pour la synthèse de composés d'intérêts.

Chapitre 5 : Etude et Synthèse d'un matériau multicyatalytique hybride (MMCH)

Le concept de catalyse hybride vise à combiner deux catalyseurs de nature totalement différente dans l'optique d'ouvrir de nouveaux chemins réactionnels. Comme décrit dans l'introduction de cette thèse, la catalyse hybride peut se graduer en plusieurs niveaux (2P1S, 1P2S et 1P1S). Les chapitres précédents ont ainsi permis de présenter les résultats obtenus pour un nouveau concept de procédé hybride en 1P2S puis en 1P1S visant la production d'AMFC à partir du HMF. Cependant il serait dans l'absolu possible d'aller encore plus loin au niveau du degré d'intégration des deux catalyseurs mis en jeu, avec l'élaboration d'un matériau multi-catalytique hybride (MMCH). Cette partie s'attèlera donc à décrire des résultats, certes préliminaires, mais très encourageants que nous avons réussi à obtenir pour la conception d'un tel catalyseur. Ayant déjà acquis une longue expérience concernant l'immobilisation des enzymes sur les supports EziGTM, celle-ci se révélant particulièrement simple à mettre en œuvre, nous avons choisi d'utiliser ce support pour tenter la combinaison de ces dernières avec nos nanoparticules métalliques. Notons également que le criblage décrit en chapitre 3 de ce manuscrit avait permis de montrer que le catalyseur Pd@EziGTMOPAL était capable de convertir environ 69 % du HMFA pour produire 9 % d'AMFC en 48 h de réaction à 50 °C, ce qui nous laissait sous-entendre le fait que ce support pourrait également permettre d'obtenir des nanoparticules actives sur nos substrats.

Les trois métaux ayant donné les meilleurs résultats tout au long des criblages de cette thèse, l'Au, le Pd et le Pt, ont été sélectionnés pour être déposés sur le support EziGTMOPAL, avec un objectif de 2 % massique. L'ICP réalisée sur ces trois catalyseurs a montré un pourcentage de 5,6 % pour l'Au, 1,4 % pour le Pd et 0,8 % pour le platine. La valeur anormalement élevée concernant le catalyseur à l'Au laisse suggérer que la taille des nanoparticules a été mal contrôlée pendant la synthèse. De ce fait des agglomérats d'or ont pu se former à la surface du support, ce qui pourrait expliquer un pourcentage aussi élevé. Notons que contrairement aux deux autres, une nouvelle technique d'immobilisation par imprégnation en excès de solvant avait été utilisée pour ce catalyseur, ce qui pourrait également expliquer ce résultat. Ainsi, une technique d'immobilisation par « sol-immobilisation » est préférée dans l'objectif d'éviter de reproduire ce résultat. Le catalyseur Pd@EziGTMOPAL, quant à lui possède une valeur proche de l'objectif, laissant supposer une dispersion des nanoparticules relativement homogènes à la surface du support. Le Pt quant à lui ne nous a pas permis d'atteindre une charge en métal aussi élevée que visée, ce qui est peut-être dû à la nature du support. Une fois les trois catalyseurs obtenus, ceux-ci ont donc été incorporés dans le criblage d'oxydation du HMFA à la fois en vial et au BioLectorPro (décrit dans le chapitre 3). Le

Au@EziGTMOPAL et le Pt@EziGTMOPAL n'ont ainsi pas conduit à la production d'AMFC, et n'ont d'ailleurs pas montré une grande activité sur le HMFA, avec 12 et 29 % de conversion respectivement. Ceci est en accord avec les charges en métal éloignées de la cible imposée pour la synthèse, et il est possible que ces catalyseurs puissent tout de même être actifs avec des nanoparticules de taille plus contrôlée, notamment au vu de la faible conversion du HMFA tout de même détectée. Aussi, il sera important d'effectuer de nouvelles synthèses pour ces deux métaux, afin de pouvoir réellement évaluer leur activité une fois immobilisée sur le EziGTMOPAL. Le Pd@EziGTMOPAL a donc, quant à lui, conduit à une conversion de presque 69 % du HMFA pour donner 9 % d'AMFC.

Suite à ces premiers résultats, nous avons donc choisi de continuer avec le Pd@EziGTMOPAL, et de tenter l'immobilisation de la *Bm*-TA purifiée sur celui-ci. Pour cela, la même méthode qu'utilisée précédemment a été employée afin d'obtenir le catalyseur *Bm*-TA+Pd@EziGTMOPAL, à partir de 200 µg d'enzyme et de 2 mg de Pd@EziGTMOPAL. La capacité de ce catalyseur à effectuer la réaction de transamination a ensuite directement vérifié sur le HMF à température ambiante (pour éviter toute oxydation du HMFA formé). L'analyse HPLC au bout de 6 heures a démontré que *Bm*-TA+Pd@EziGTMOPAL était capable de convertir la totalité du HMF présent dans le milieu réactionnel en HMFA (Figure 69). Aucune inhibition due au palladium n'a donc été observée.

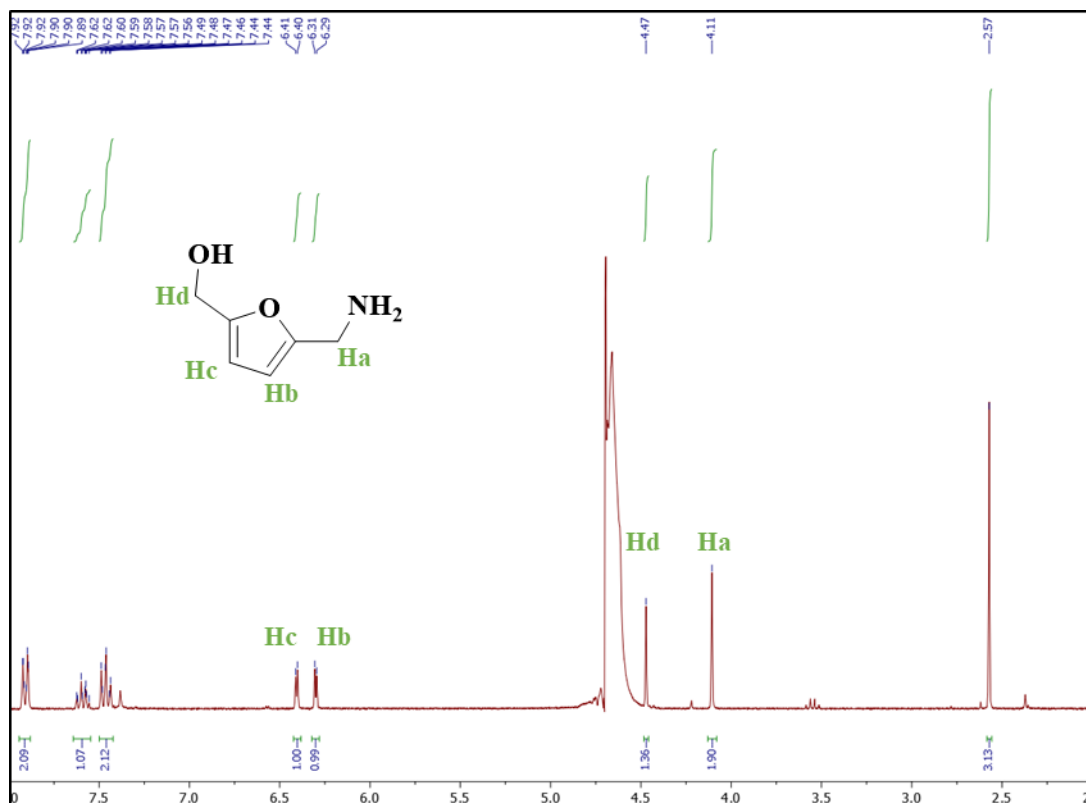


Figure 69 : RMN ¹H du milieu réactionnel après 6 h de transamination avec le *Bm*-TA@Pd@EziGTMOPAL à température ambiante.

Une fois la capacité de transamination du catalyseur vérifiée, celui-ci a directement été testé selon le procédé hybride. De la même manière que pour la mise au point du procédé en 1P1S, nous avons choisie de faire varier le ratio enzyme/nanoparticules métallique, ayant précédemment démontré que celui-ci pouvait avoir une influence importante sur l'efficacité des deux réactions successives. Aussi, cinq ratios enzyme/nanoparticules (g/g) ont été testés (200 µg d'enzymes immobilisées sur 2, 4, 8, 12 et 20 mg de Pd@EziGTMOPAL (notés Pd₂, Pd₄, Pd₈, Pd₁₂ et Pd₂₀ respectivement)). Comme décrit précédemment, la première condition, avec 2 mg de Pd@EziGTMOPAL (Pd₂) n'a pas présenté de limitations concernant l'étape de transamination, et il en a évidemment été de même pour les autres ratios testés. Concernant l'étape d'oxydation, les résultats ont quant à eux été beaucoup plus nuancés comme attendu. Ceux-ci sont présentés dans le Tableau 21. De manière très intéressante, une conversion du HMFA en AMFC (5 %) a pu être observée à partir du Pd₁₂. Ce taux de conversion s'est vu augmenter jusqu'à 8 % dans le cas du Pd₂₀. Notons de plus qu'une conversion de 18 % et 28 % du HMFA a respectivement pu être observés avec ces deux catalyseurs. Cependant, rappelons que, comme dans le cas de la mise au point de la 1P1S, l'activité du catalyseur chimique se trouve fortement diminuée dans les conditions communes mises en place.

Ces résultats démontrent ainsi que, d'une part, une fois de plus l'importance du ratio entre l'enzyme et le catalyseur chimique. Mais surtout qu'en optimisant les conditions d'immobilisation et les conditions réactionnelles, il serait peut-être envisageable d'aboutir à la production d'un catalyseur multi-catalytique hybride efficace pour la conversion du HMF en AMFC, ou au moins en AMFA.

Tableau 21 : Taux de conversion à t 48 h obtenu lors de la mise en œuvre du procédé hybride 1P1S contenant le MMCH *Bm*-TA@Pd@EziG™OPAL pour la conversion directe du HMF en AMFC.

Catalyseur Pd@OPAL (mg)	2	4	8	12	20
B9AZ94 immobilisée (µg)	200	200	200	200	200
Code de réaction	Pd₂	Pd₄	Pd₈	Pd₁₂	Pd₂₀
HMF	0 %	<1 %	<1 %	<1 %	1 %
HMFA	>99 %	>99 %	>99 %	82 %	72 %
AMFC	0 %	0 %	<1 %	5 %	8 %

Afin d'améliorer ce catalyseur, l'emploi des supports CORAL et AMBER pourra ainsi être envisagé. Mais il sera également intéressant, comme nous l'avons évoqué précédemment, d'envisager d'autres supports, comme le UiO-66-NH₂ par exemple, qui pourraient permettre une meilleure compartimentation des catalyseurs, ainsi qu'une protection du catalyseur chimique vis-à-vis du donneur d'amine. En parallèle de ces manipulations, nous avons réussi la synthèse d'un MMCH pour la formation directe d'AMFC à partir de HMF. Ce catalyseur hybride consiste en des NPs de palladium adsorbé sur le support OPAL avec une immobilisation enzymatique venant la recouvrir. Jusqu'ici toutes les réactions ont été effectuées en milieux aqueux pour permettre à l'enzyme de fonctionner au maximum de ses capacités. Cependant une implémentation du procédé en milieu organique peut être envisagée. Dans cette optique, une adaptation des conditions de fonctionnement du catalyseur chimique à l'enzyme serait effectuée. Il a été prouvé que la transamination était possible grâce à l'immobilisation sur un support EziG™@AMBER. De ce fait, un éventail de solvants pourrait être testé. Cela nous permettrait probablement une oxydation plus sélective du HMF envers les composés désirés susceptibles d'être convertis en dérivés aminés dans un second temps.

Chapitre 6 : Extension des procédés hybrides pour la synthèse de nouvelles amines issues de la biomasse

1 Sélection de synthons utilisés comme substrats

Forts de nos premiers résultats obtenus pour la conversion du HMF en AMFC à l'aide de procédés hybrides combinant transaminases et nanoparticules métalliques chargées de réaliser l'oxydation des fonctions alcool et carbonyle présentes, nous avons voulu voir si nous pouvions étendre ce concept à d'autres synthons, en particulier issus de la biomasse. Ainsi, plusieurs substrats présentant ce type de fonctions, et pouvant conduire à la formation de composés aminés valorisables, ont été sélectionnés. La structure de ces molécules est décrite en Figure 70.

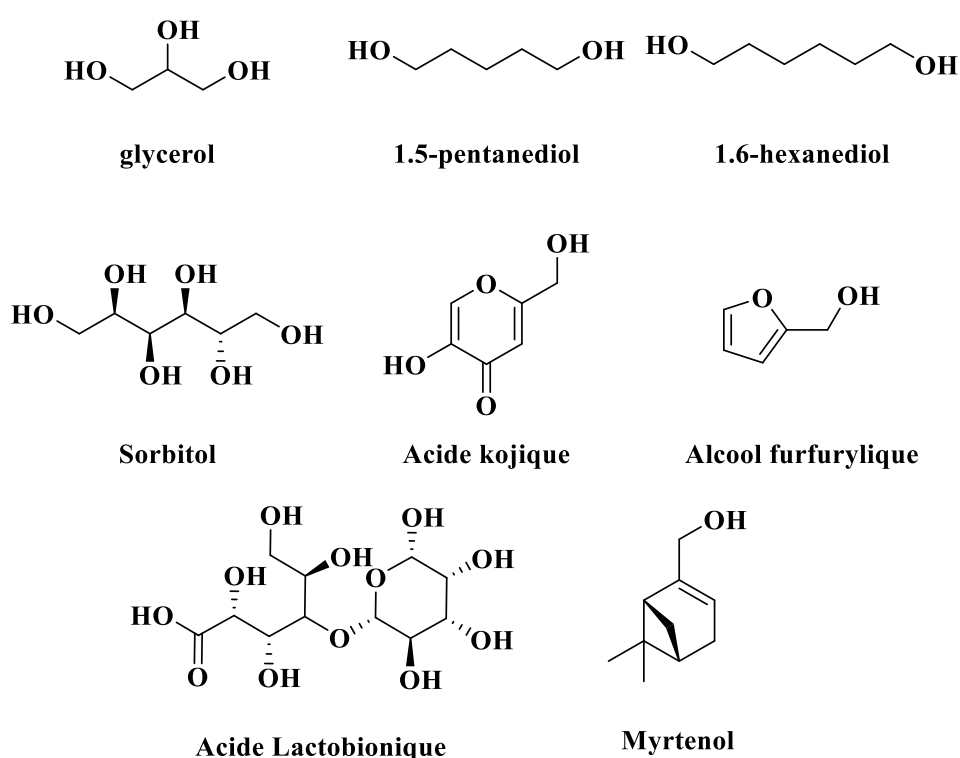


Figure 70 : Structure des molécules criblées pour la valorisation du procédé hybride.

La première molécule que nous avons choisie est le glycérol. Il s'agit d'un co-produit généré lors de la production de biodiesel et sa valorisation peut, par exemple, se traduire par une conversion en acide glycérique et tartronique, qui sont eux-mêmes des « building blocks » à haute valeur ajoutée ¹⁹². Cependant, l'animation du glycérol reste très peu étudiée ¹⁹³. De la même manière, le 1,5-pentanediol et le 1,6-hexanediol ont été sélectionnés pour leur capacité potentielle à former du bio-nylon, les diamines correspondantes entrant dans la synthèse de ce

type de polymères à travers polycondensation avec des diacides. Dans notre exemple, l'idée était de pouvoir peut-être envisager la production de ces deux types de fonctions directement à partir à partir du dialcool pour une potentielle polymérisation *in situ* comme pour l'AMFC. L'alcool furfurylique a lui été sélectionné, car sa transformation permettrait la synthèse d'une nouvelle furfurylamine (amine furfurylique) qui pourrait également être valorisable. L'acide kojique est un métabolite naturel produit par des champignons. Cette molécule et ces dérivées possèdent de nombreuses propriétés telles qu'une activité antimicrobienne, antivirale ou encore pesticide ¹⁹⁴. La synthèse d'un nouveau dérivé aminé pourrait mener à une amélioration de ses activités (meilleure pénétration des membranes bactériennes par exemple). Le sorbitol et l'acide lactobionique ont quant à eux été sélectionnés à cause de la grande concentration en fonctions alcools. De ce fait, des molécules multifonctionnelles avec des fonctions carbonyles, amine et acide carboxylique pourraient être synthétisés de manière rapide. Notons également que la transamination des sucres est un domaine encore assez mal connu, et l'oxydation de ces derniers pourrait peut-être permettre de générer de nouveaux substrats à étudier dans ce cadre. Le dernier substrat que nous avons sélectionné était le myrténol. Ce terpénoïde fait partie de composés qui trouvent des applications dans de nombreux secteurs comme la pharmaceutique, l'industrie agroalimentaire et la parfumerie ¹⁹⁵. Les molécules issues de cette famille présentent généralement un centre asymétrique et de nombreux groupes fonctionnels extrêmement intéressants d'un point de vue réactivité. Les terpènes aminés, en plus d'être des molécules plateformes à haute valeur ajoutée, peuvent ainsi être impliqués dans la synthèse fine d'agents anticancéreux ¹⁹⁶. Un des problèmes majeurs pour l'obtention de ces molécules clés est leur provenance. Effectivement, comme la plupart des ressources utilisées aujourd'hui, la synthèse de ces molécules est issue de ressources fossiles et donc non pérenne. C'est pour cela qu'une alternative est donc absolument indispensable dans ce contexte. La synthèse de terpènes aminés, notamment à partir de myrténol se fait grâce à une catalyse hétérogène ^{191,195,197,197-206}, principalement par une réaction de type « one-pot » en présence de métaux supportés sur une variété de supports oxydés (TiO₂, CeO₂ par exemple). Cependant cette synthèse présente de nombreux désavantages, notamment la présence de réactions secondaires indésirables. Ces réactions réduisent donc la sélectivité du catalyseur. De plus ces synthèses sont coûteuses en énergie (synthèse effectuée à 180 °C, sous atmosphère azote à 9 bars de pression). Trouver une approche intégrée et durable, à basse température, dans un solvant non toxique, représente donc un challenge très intéressant pour la valorisation de ce type de composés et la production d'amines terpénique en général.

2 Réactions d'oxydations sur les substrats sélectionnés

Afin d'étudier la transposition de notre système sur ces molécules, nous avons commencé par étudier leur réactivité vis-à-vis de l'étape d'oxydation, simplement parce que ces dernières, contrairement au HMF, ne possèdent pas de fonction carbonyle transaminables. Pour cela, nous avons choisi de tester sur elle mes quatre catalyseurs ayant déjà prouvé une bonne capacité catalytique lors des études précédentes (chapitre 3 et 4) : Au@CaO (C4), Au@CeO₂ (C22), Au@UiO-66-NH₂ (C24) et Au@TiO₂ (C31). Les mêmes conditions (50 °C) qu'utilisées précédemment (chapitre 3) pour l'étape d'oxydation ont été mises en œuvre pour ce criblage en vial de 2 ml. Les combinaisons catalyseur/substrat qui ont montrés une conversion, ainsi que les produits résultants de ces oxydations sont présentés dans le Tableau 22.

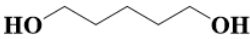
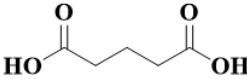
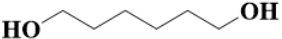
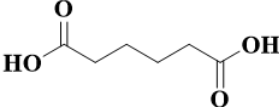
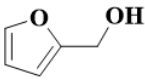
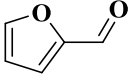
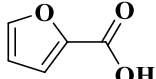
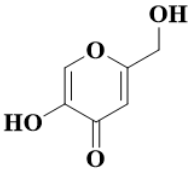
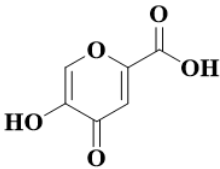
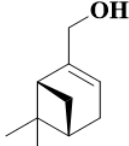
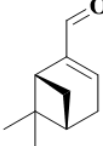
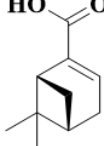
Après 48 h de réaction, comme nous avons tout d'abord pu le constater, ni le glycérol, ni l'acide lactobionique, ni le sorbitol n'ont montré de conversion significative. Une analyse RMN¹H réalisée sur les milieux bruts réactionnels ne montrait aucune apparition de nouveaux pics caractéristiques d'un produit. Les cinq autres substrats (*1,5*-pentanediol, *1,6*-hexanediol, furfural alcool, acide kojique et myrténol) ont quant à eux pu être convertis en aldéhyde et/ou acide carboxylique avec au moins un des catalyseurs.

Concernant le *1,5*-pentanediol et le *1,6*-hexanediol (entrée 1 et 2, Tableau 24), seul le catalyseur Au@CaO a montré une activité, avec apparition uniquement de l'acide *1,5*-pentandioïque et l'acide *1,6*-hexanedioïque après 48 h de réaction (Annexe D, Figure 106 et Figure 108). Dans le cas de ces deux substrats, les résultats suggéraient donc que la formation de la fonction aldéhyde était l'étape limitante et que la fonction acide carboxylique correspondante était immédiatement formée une fois l'aldéhyde présent dans le milieu. De manière additionnelle, n'ayant pas observé de monoacide, les deux fonctions alcool semblent autant réactives que celles des mono-acides correspondants. Cela supposait donc que la mise en œuvre du procédé hybride 1P2S serait difficile à mettre en œuvre, les intermédiaires possédant une fonction aldéhyde étant présents que de manières transitoires dans le mélange réactionnel. En conclusion, seul un procédé 1P1S semblerait envisageable avec ces deux substrats, en espérant que les groupements aldéhydes formés seraient plus rapidement pris en charge par la transaminase que par le catalyseur chimique.

Dans le cas de l'alcool furfurylique et de l'acide kojique (Annexe D, Figure 110 et Figure 112), les quatre catalyseurs ont montré une activité. Dans le cas de l'alcool furfurylique,

les trois catalyseurs Au@CeO₂ (C22), Au@UiO-66-NH₂ (C24), et Au@TiO₂ (C31), ont réalisé la production de furfuryl aldéhyde et d'acide furoïque (entrée 3 et 4, Tableau 24). *A contrario*, le seul produit visible dans le cas du catalyseur Au@CaO était l'acide furoïque. Aussi, nous avons pu supposer que pour les 3 premiers catalyseurs, la formation de l'acide était peut-être l'étape limitante, là où pour le Au@CaO il s'agissait sûrement de celle de l'aldéhyde. Dans le cas de l'acide kojique, l'acide carboxylique correspondant était observé en présence des quatre catalyseurs, sans que l'aldéhyde ne soit détectable.

Tableau 22 : Schémas réactionnels des réactions d'oxydation en phase liquide sur 1) le 1,5-pentanediol 2) le 1,6-hexandiol 3) le furfuryl alcool 4) l'acide kojique 5) le myrténol.

Entrée	Substrats	Catalyseur	Produits
1	 1.5-pentanediol	$\xrightarrow{\text{Au@CaO}}$	 acide dipentanoïque
2	 1.6-hexandiol	$\xrightarrow{\text{Au@CaO}}$	 acide dihexanoïque
3	 Furfuryl alcool	$\xrightarrow[\text{Au@UiO-66-NH}_2]{\text{Au@CaO, Au@TiO}_2, \text{Au@CeO}_2}$	 +  Furfural aldéhyde Acide furoïque
4	 Acide kojique	$\xrightarrow[\text{Au@UiO-66-NH}_2]{\text{Au@CaO, Au@TiO}_2, \text{Au@CeO}_2}$	 Acide 5-hydroxy-4-pyroneïque
5	 Myrténol	$\xrightarrow[\text{Au@UiO-66-NH}_2]{\text{Au@CaO, Au@TiO}_2, \text{Au@CeO}_2}$	 +  Myrténal Acide myrténiqque

Enfin, concernant l'oxydation du myrténol (entrée 5, Tableau 24), d'excellents résultats ont pu être obtenus. L'analyse RMN ¹H réalisée sur les milieux réactionnels avec le Au@UiO-

66_NH₂ (**B**), le Au@CaO (**C**), le Au@TiO₂ (**D**) et le Au@CeO₂ (**E**) est disponible en Figure 71.

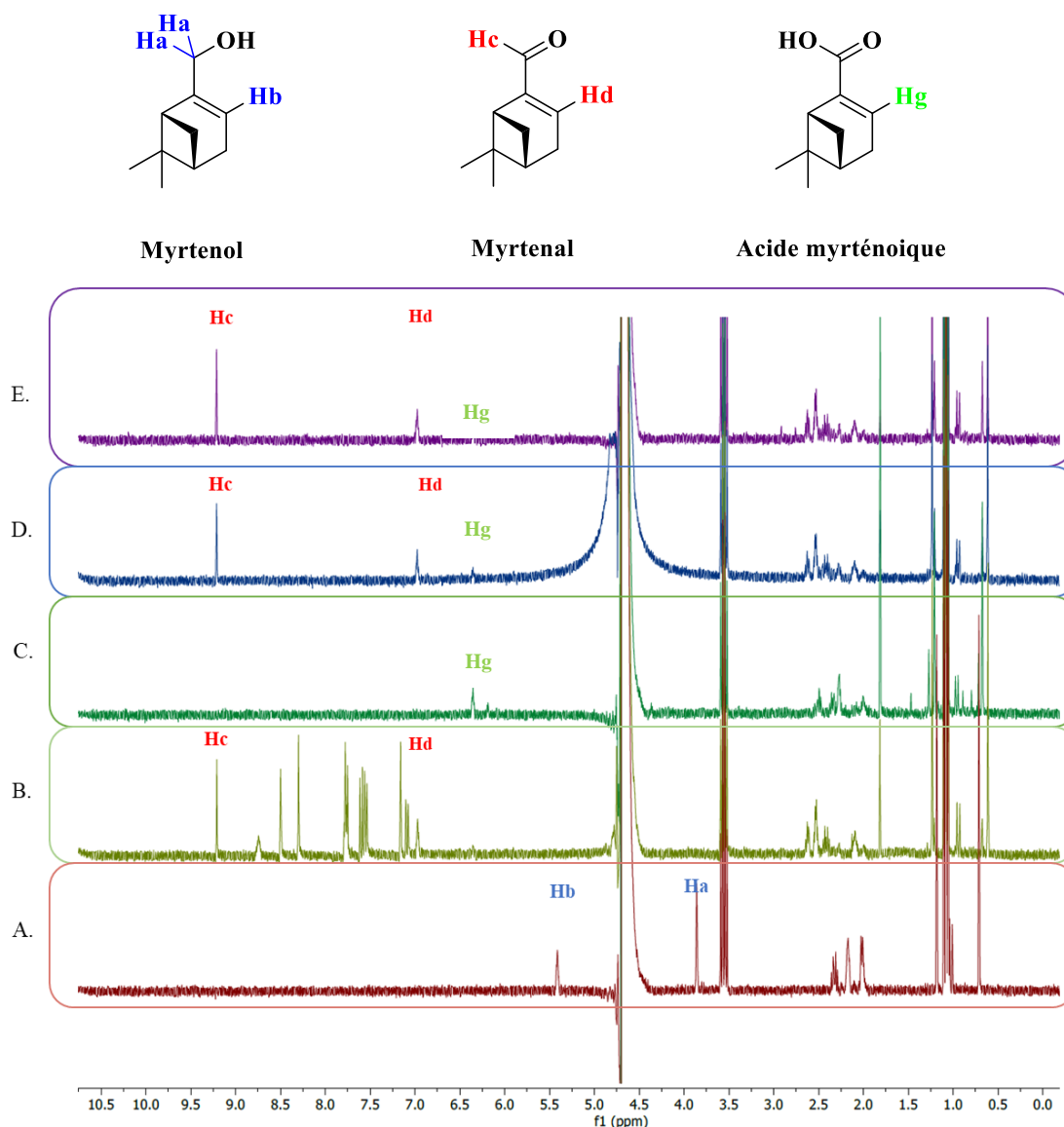


Figure 71 : RMN ¹H de la réaction d'oxydation du myrténol à t48 h à 50 °C. Les réactions sont effectuées dans un vial de GC fermés de 2 ml. La solution mère est composée de 10 mM de myrténol dans un tampon phosphate de potassium 100 mM à pH 7,3 et mis à l'étuve sur un carrousel à 25 rpm et à 50 °C. 4 mg du catalyseur désiré sont ajoutés au milieu. (**A**. Blanc réactionnel sans catalyseur **B**. Réaction avec le catalyseur Au@UiO-66-NH₂ **C**. Réaction avec le catalyseur Au@CaO **D**. Réaction avec le catalyseur Au@TiO₂ **E**. Réaction avec le catalyseur Au@CeO₂).

Au vu de la diversité des signaux émis par le myrténol et de ses dérivés, l'analyse des résultats a principalement été effectuée sur deux pics caractéristiques : les protons situés sur la double-liaison (**Hb**, **Hd** et **Hg**) et les protons en alpha de la fonction alcool (**Ha** et **Hc**). Le premier point qu'il est intéressant de noter est que chaque réaction a montré une consommation

du myrténol supérieure à 95 %. Cela a été confirmé par la complète disparition des signaux des protons **Ha** et **Hb** situés respectivement à 3,97 et 5,51 ppm. Dans un second temps, ces résultats témoignent d'un contrôle de la production en acide en fonction du catalyseur utilisé. A ce titre, les catalyseurs Au@UiO-66-NH₂, Au@TiO₂ et Au@CeO₂ ont tous les trois produits presque exclusivement du myrténol. Cela se traduit par l'apparition des pics correspondant aux protons **Hc** et **Hd** respectivement à 9,31 ppm et 7,07 ppm. Une faible quantité d'acide myrténoïque a tout de même pu être observée avec le Au@CeO₂ et le Au@TiO₂, à travers la présence du pic correspondant aux protons **Hg** à 6,34 ppm bien que celui-ci soit presque inexistant avec le second catalyseur. Ajoutons que dans le cas du Au@UiO-66-NH₂ une forêt de pics situés entre 6 et 8 ppm a également été observée. Ceux-ci pics correspondent probablement à un relargage d'acide téréphtalique depuis le support UiO-66-NH₂. Comme nous l'avions précédemment déjà remarqué. Le catalyseur Au@CaO (Figure 71.C) a, à l'inverse, montré une production exclusive d'acide myrténoïque. Cela est confirmé par la présence unique du pic caractéristique **Hg** à 6,34 ppm. Ce faisant, il est alors intéressant de constater que ces résultats sont en accord avec ceux observés sur les autres substrats de cette étude, mais également avec les tendances constatées lors de la conversion du HMFA. Le Au@CaO semble en effet être globalement bien plus actif que les autres, et conduit toujours à la formation exclusive d'acide en 48 h de réaction dans ces conditions. Ajoutons qu'aucune trace d'un précipité n'a été détectée ici, ce qui conforte notre hypothèse concernant une polymérisation de l'AMFC en présence de ce catalyseur à cause de la présence de la fonction amine de ce dernier, fonction absente ici. Notons également qu'aucun donneur d'amine n'était encore présent dans ces conditions, et que ce dernier pourrait peut-être également impliquer dans un tel processus.

En conclusion de ce premier criblage, nous avons donc pu observer la conversion de 5 des substrats que nous avons sélectionnés pour la diversification de notre procédé hybride. Ceux-ci ont été sélectionnés pour la suite des études.

3 Premiers essais concernant la mise en œuvre d'un procédé hybride en 1P1S sur les 5 substrats précédemment sélectionnés.

Suite à cette première étude, nous avons dans un premier temps directement voulu éprouver notre procédé hybride en 1P1S pour la conversion des composés bio-sourcés sélectionnés. Compte tenu du fait que le Au@CaO a très clairement été le catalyseur qui a fait preuve de la meilleure activité envers ces substrats, nous avons choisi de ne tester que lui pour cette étude.

Concernant l'étape de transamination, celle-ci a été réalisée avec la *Bm*-TA, immobilisée sur EziG™OPAL, et avec la (*S*)-MBA comme donneur d'amine de la même manière que précédemment.

Pour les deux premiers substrats, le *1,5*-pentanediol et le *1,6*-hexanediol, il a été difficile de pouvoir réellement quantifier leur conversion par RMN, la structure des produits aminés formés (*1,5*-diaminepentane et *1,6*-diaminehexane) leur étant très proche. Malgré cela, l'apparition d'un pic à 2.31 ppm correspondant probablement aux protons en alpha de la fonction amine des composés a pu être observée, traduisant le fonctionnement du système hybride. Ceci a pu être confirmé également par la présence des pics caractéristiques de l'acétophénone à 7,58, 7,69 et 8.00 ppm (groupement phényle) ainsi qu'à 2,68 ppm (singulet, méthyle en alpha de la cétone, annexes D Figure 107 et Figure 109). La trop faible intensité des signaux rend la quantification par RMN difficile. D'une manière générale la RMN est précise à 5 %. De ce fait, si nous voulons quantifier ces réactions, une méthode HPLC devra être mise au point. Notons à propos qu'aucune trace des intermédiaires aldéhydes n'a été observée dans le milieu réactionnel, ce qui démontre encore une fois un rapport de vitesse entre l'oxydation et la transamination très favorable pour cette dernière aux quantités en catalyseurs utilisées. De la même manière, comme escomptée, aucune trace de diacide n'a ici été observée.

Dans le cas de l'alcool furfurylique, après 48 h de réaction, aucune trace du furfuraldéhyde n'a également été observée, alors que là encore, les pics caractéristiques de l'acétophénone à 2,68, 7,58, 7,69 et 8.00 ppm étaient bien présents (Annexe D, Figure 111). De la même façon que précédemment, l'apparition d'un pic à 4.21 ppm a permis de confirmer la présence de la furfurylamine, et donc la faisabilité du procédé en 1P1S. De la même manière que précédemment, la quantification est difficile.

A l'inverse, l'acide kojique n'a quant à lui visiblement pas été oxydé dans les mêmes conditions. D'une part, aucun pic d'aldéhyde ou d'acide n'a pu être détecté, mais surtout l'absence d'un pic correspondant à l'amine potentiellement formée par la transamination, ainsi que des pics caractéristiques de l'acétophénone confirment qu'effectivement aucun aldéhyde n'a été produit en 48 h (Annexe D, Figure 113).

Pour ce qui est du myrténol, qui était le substrat le plus prometteur avec une conversion complète lors du criblage précédent, nous avons choisi de réaliser les tests en 1P1S avec les 4 catalyseurs au lieu du Au@CaO uniquement. La Figure 72 présente ainsi les résultats RMN ¹H des milieux réactionnels bruts après 48 h (A. Blanc réactionnel sans catalyseurs

B. Catalyseurs Au@UiO-66_NH₂ **C.** catalyseur Au@CaO **D.** Catalyseur Au@TiO₂ **E.** Catalyseur Au@CeO₂).

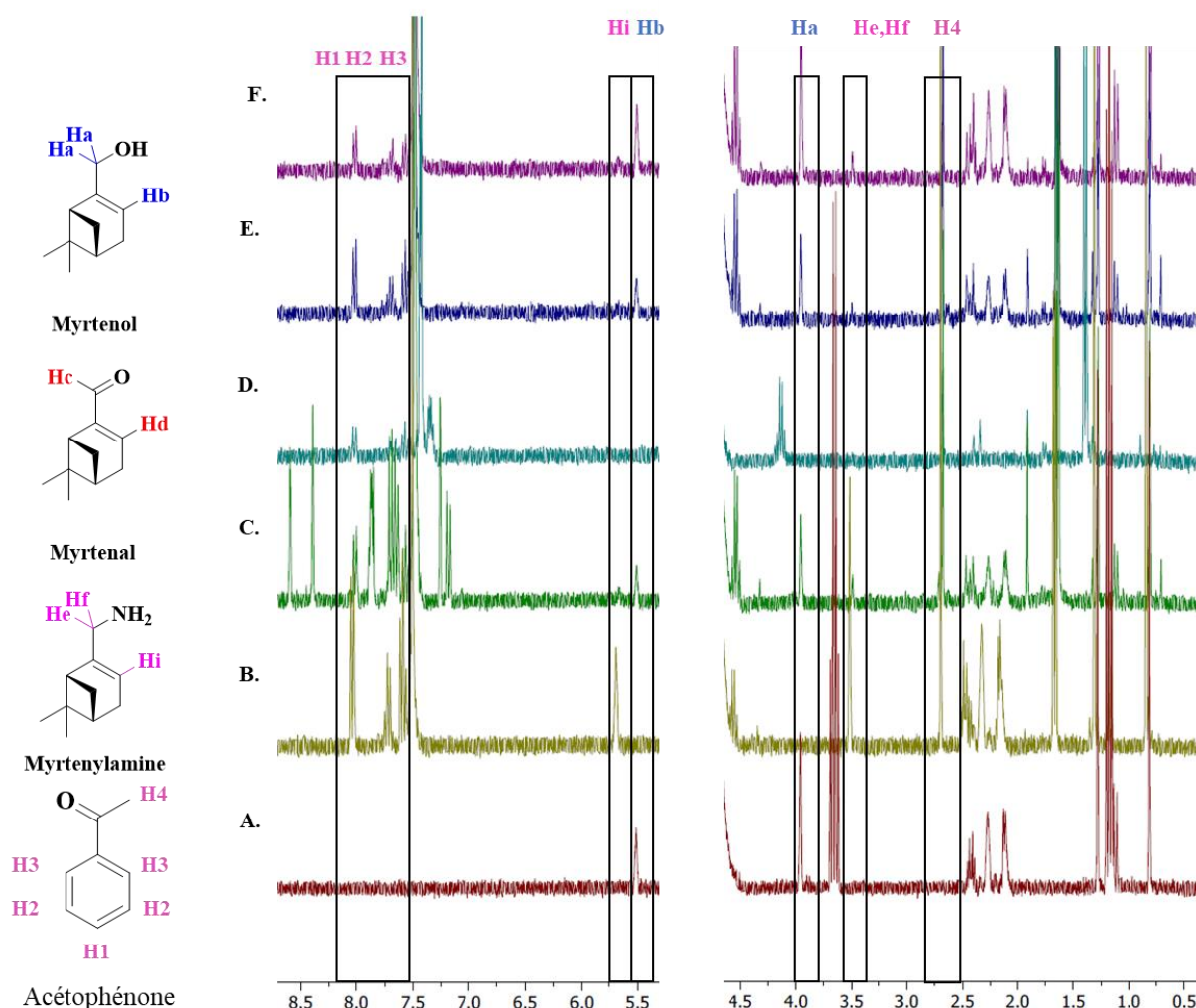


Figure 72 : RMN ¹H (300 MHz, D₂O) à t48 h des produits présents dans le procédé hybride « one-pot/one-step » lors de la synthèse de la myrténylamine à partir du myrténol. Les réactions ont été effectuées en vial de GC scellés (2 ml) sur 10 mM de myrténol dans un tampon KH₂PO₄ 100 mM pH 7,3 avec 10 mM de (*S*)-MBA et 1 mM de PLP. On introduit 4 mg de catalyseur et 200 µg de *Bm*-TA immobilisée sur un support EziG™@OPAL **A.** Blanc réactionnel sans catalyseur **B.** Myrténylamine **C.** Au@UiO-66_NH₂ (C24) **D.** Au@CaO (C4) **E.** Au@TiO₂ (C31) **F.** Au@CeO₂ (C22).

Pour commencer, quel que soit le catalyseur utilisé, aucune trace du myrtenal n'a été observée dans le mélange après 48 h, les pics caractéristiques correspondants aux protons **Hc** (9,31 ppm) et **Hd** (7,07 ppm) n'étant pas présents sur les spectres RMN. Pour le Au@UiO-66_NH₂, le Au@TiO₂ et le Au@CeO₂, seul le produit aminé, la myrténylamine (Annexe D, Figure 115) semble avoir été produit, avec ses pics caractéristiques à 3,52 ppm (**He**, **Hf**) et

5.69 ppm (**Hi**). Même si son rendement reste assez faible, ce composé est observé avec chacun des catalyseurs sauf avec le Au@CaO. Ces deux observations démontrent tout de même, une fois encore 1) la capacité de la transaminase à prendre en charge l'aldéhyde formé (myrténal) mais également 2) sa vitesse importante comparée à l'oxydation. Concernant le Au@CaO, tout le myrtenol semble avoir été consommé, comme espéré, cependant, aucune trace de la myrtenylamine, ni même de l'acide myrténoïque n'a pu être détectée en RMN. De manière additionnelle, aucun produit inconnu ne semble apparaître sur le spectre, ce qui laisserait penser à la formation, ici encore, d'un produit sous forme solide. De la même manière que pour la synthèse d'AMFC, des études plus approfondies devront être réalisées pour comprendre ce qui se passe effectivement avec ce catalyseur.

En conclusion de cette étude, l'exploitation du procédé hybride 1P1S sur des substrats biosourcés a permis de mettre en évidence trois nouvelles réactions hybrides sous forme de preuve de concept, menant à de nouveaux synthons aminés. Notre procédé hybride a ainsi permis la formation de 1,5-diaminopentane, d'hexamethylenediamine, de la furfurylamine correspondant au furfural, et de myrtenylamine. Malgré cela, dans tous les cas, l'activité du catalyseur s'est vue largement diminuée par rapport à celle mesurée lors du criblage en absence de l'enzyme et du donneur d'amine, mettant encore une fois en évidence les phénomènes d'empoisonnement croisés entre catalyseurs. Cela dit, l'enzyme a su montrer dans les conditions utilisées une bonne acceptation des substrats carbonyles produits, ainsi qu'une vitesse de transamination largement supérieure à celle de l'oxydation des aldéhydes en acides correspondants, évitant ainsi la formation de ces derniers comme espérée.

Malgré cela, l'oxydation ayant été très fortement ralentie, seuls de faibles rendements en produits aminés ont pu être obtenus avec chacune des réactions. Aussi, afin d'essayer d'améliorer ces derniers, en particulier pour le myrtenol, nous nous sommes tournés vers le test du procédé en 1P2S cette fois. Pour cela nous avons commencé par étudier plus finement la cinétique d'oxydation de celui-ci. La Figure 73 représente le suivi cinétique de l'oxydation du myrtenol par le catalyseur Au@TiO₂ sur 48 h à 50 °C. La même manipulation a été effectuée avec le catalyseur Au@CeO₂ (C22) et celui-ci a eu un comportement similaire à l'Au@TiO₂ (C31). Pour plus de clarté, le zoom est effectué entre 5.2 et 7.8 ppm où l'on peut facilement observer la disparition et l'apparition des pics caractéristiques présents sur la double liaison des différents substrats et produit de réaction. Une consommation complète du myrtenol a été observée après 32 h de réaction (disparition du pic **Hb** à 5.51 ppm). Cependant, le pic caractéristique de l'acide myrténoïque (**Hg**, 6,34 ppm) était déjà présent lors de ce prélèvement.

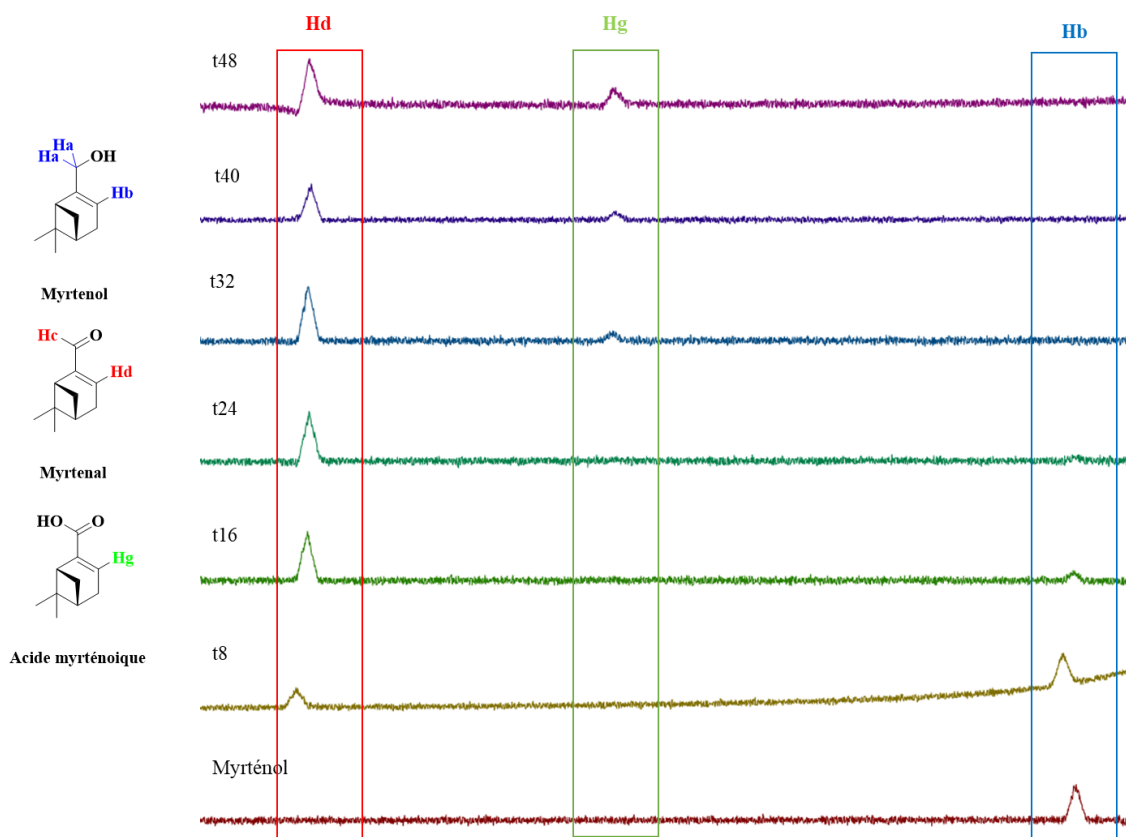


Figure 73 : Suivi cinétique RMN de l'oxydation du myrténol par RMN¹H à 8,16,24,32,40 et 48 h par un catalyseur Au@TiO₂ dans un milieu tamponnée (pH 7.3, 100 mM) à 50°C.

Ainsi, afin d'éviter la formation de l'acide myrtenoïque comme produit secondaire, nous avons choisi d'ajouter la transaminase après seulement 24h d'oxydation, dans l'espoir que la suroxydation ne serait alors pas observée, et que le catalyseur chimique pourrait tout de même finir de convertir la quantité de myrténol restante. Comme nous sommes en RMN, nous pouvons estimer une conversion >95 % du myrténol en myrténal après 24 h d'oxydation à 50 °C.

Aussi, dans la mesure où cette fois nous cherchions à commencer par la mise au point d'un système en 1P2S, nous avons choisi d'écarter le Au@CaO dans un premier temps, celui-ci n'étant réellement viable qu'en système 1P1S de par sa capacité à rapidement convertir le myrténal en acide myrtenoïque. De la même manière, le Au@UiO-66-NH₂ n'a pas non plus été testé, car le relargage de son ligand pourrait s'avérer problématique lors des études suivantes pour l'isolement des produits.

4 Synthèse de la myrténylamine à l'aide du procédé hybride 1P2S

De la même façon que ce que nous avons décrit dans le chapitre 2 de ce manuscrit pour l'obtention de l'AMFC, un procédé en 1P2S a été testé pour la synthèse de la myrténylamine à partir du myrténol. Les conditions réactionnelles sélectionnées ont été les mêmes que pour la 1P2S précédente, à savoir 50 °C, dans le tampon de la *Bm*-TA, avec la (*S*)-MBA comme donneur d'amine, et une réaction en vials. Concernant les catalyseurs, la *Bm*-Ta sous sa forme libre et immobilisée sur EziGTMOPAL a été utilisée, et nous avons sélectionné le Au@TiO₂ et le Au@CeO₂ compte tenu des résultats et postulats précédemment énoncés. De la même manière, en nous appuyant sur l'étude cinétique décrite juste avant, nous avons démarré la seconde étape, de transamination à température ambiante (24 h), au bout de 24h d'oxydation, afin d'éviter la formation de l'acide myrtenoïque. Malgré le fait que la *Bm*-TA soit thermostable, nous avons choisi de ne pas appliquer la même température pour la seconde étape afin de limiter la formation d'acide myrtenoïque dans le milieu réactionnel. En faisant cela, nous espérons une conversion complète du myrténol en myrténylamine pour un rendement final >99 %. Les résultats obtenus dans ces différentes conditions sont résumés en Figure 74.

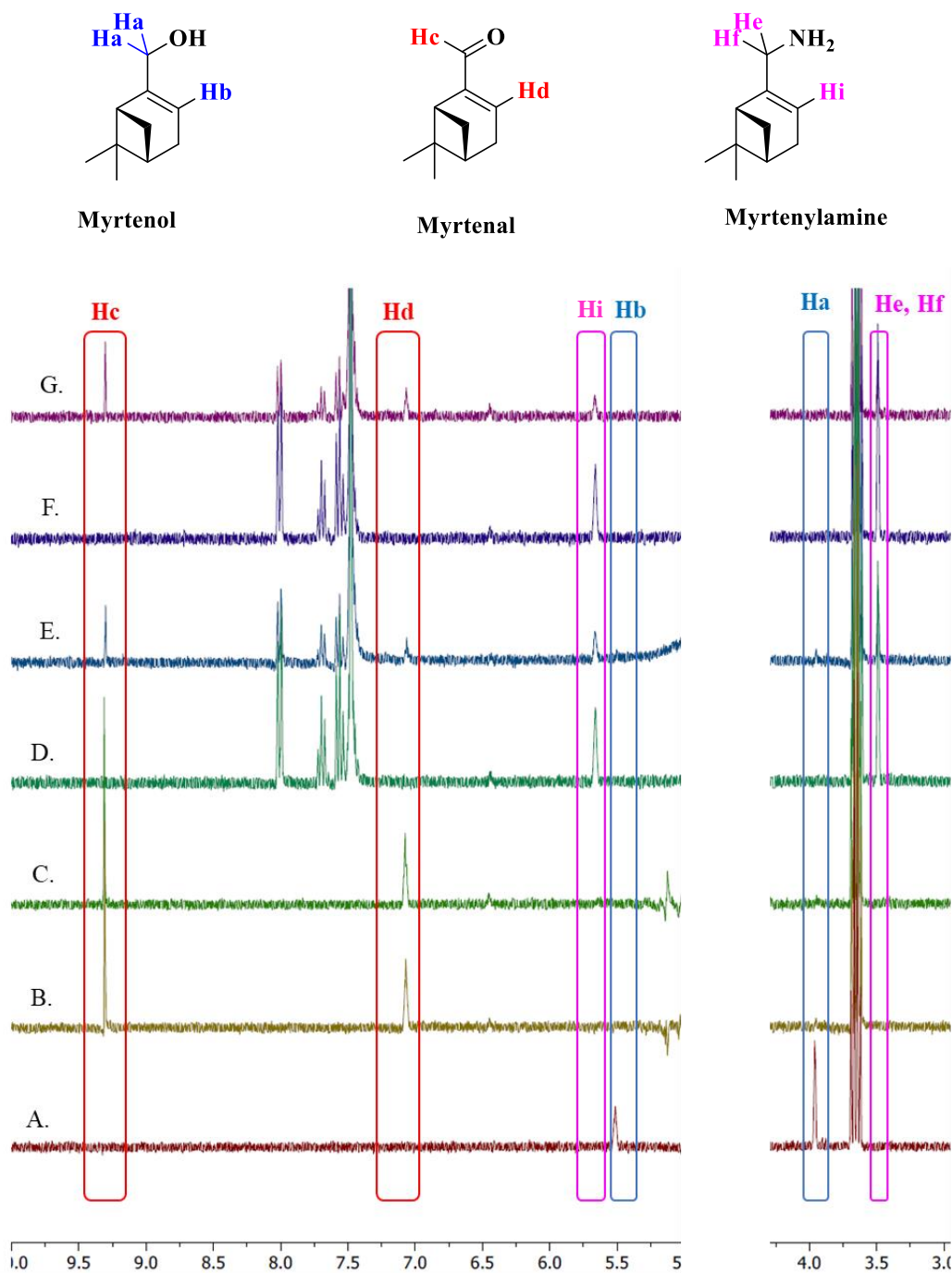


Figure 74 : RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH_2PO_4 pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM de myrténol avec 10 mM de (*S*)-MBA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 μg de *Bm*-TA immobilisé sur 1 mg de EziGTMOPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C . **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Blanc sans enzyme, Au@CeO₂ **C.** Blanc sans enzyme, Au@TiO₂ **D.** Au@CeO₂ + *Bm*-TA libre **E.** Au@CeO₂ + *Bm*-TA immobilisée **F.** Au@TiO₂ + *Bm*-TA libre **G.** Au@TiO₂ + *Bm*-TA immobilisée.

Le spectre A représente ainsi la RMN du blanc réactionnel sans aucun catalyseur après 48 h de réaction. Comme attendu, seul le myrténol est présent dans le milieu réactionnel (protons **Hb** et **Ha**). Ce premier blanc nous indique que le myrténol n'est pas dégradé thermiquement ou oxydé naturellement dans ces conditions. Les Figure 74.B et C représentent les blancs réactionnels uniquement en présence d'Au@TiO₂ et Au@CeO₂ respectivement. Comme attendu en 24h, les résultats sont similaires à ceux obtenus lors de la cinétique d'oxydation, avec une conversion quasi totale du myrténol en myrténal (**Hc** et **Hd**), et seulement une très faible production d'acide myrtenoïque détecté par RMN.

Si l'on s'intéresse aux véritables réactions maintenant, Figure 74. D, E, F et G, on remarque en premier lieu qu'aucune trace de myrténol n'est là encore observée en RMN, et que le myrténal est là encore très majoritaire, avec une très faible proportion d'acide myrtenoïque en accord avec les témoins sans enzyme. Cependant, après 24 h de transamination, du myrténal est encore présent dans le milieu (protons **Hc** et **Hd**) lorsque l'enzyme est utilisée sous sa forme immobilisée (Figure 74.E et G). *A contrario*, lorsque l'enzyme est utilisée sous forme libre dans le milieu réactionnel, une conversion complète du myrténal en myrténylamine est observée, avec un rendement final en cette dernière >95 % pour les Au@TiO₂ et Au@CeO₂ respectivement. Ceci peut s'expliquer par le fait que, pour rappel, nous avons globalement remarqué une activité inférieure de la transaminase une fois immobilisée, phénomène qui a peut-être été amplifié ici par le fait que la transamination ait été faite à température ambiante, température non optimale pour l'enzyme, et non à 50 °C comme précédemment. En revanche ce changement de température permet d'observer le procédé dans le cas où l'on chercherait à limiter sa consommation en énergie, ceci étant un des buts que nous nous étions fixés au début de ce travail de thèse.

Pour finir, il convient de préciser que, de la même façon que pour la 1P2S pour la synthèse d'AMFC, la même étude a été réalisée avec l'*iso*-propylamine (1/10, mol) comme donneur pour la transamination. Là encore, une conversion complète du myrténal a pu être observée lorsque la *Bm*-TA a été introduite sous forme libre dans le milieu réactionnel, et du myrténal était encore bien présent après 24 h dans le cas de l'enzyme immobilisée. Cependant avec un rendement final de >95 % pour le Au@TiO₂ et Au@CeO₂ et l'enzyme libre respectivement dans les meilleures conditions, nous avons montré qu'une fois encore l'*iso*-propylamine pouvait être substituée de manière efficace à la (*S*)-MBA comme donneur pour ce type de procédé, toujours dans l'objectif de le rendre plus économe en atomes et plus durable.

En conclusion de ce dernier travail, nous avons pu tester la mise en œuvre de notre procédé hybride, combinant une transaminase avec des nanoparticules métalliques immobilisées pour la valorisation d'un panel de nouveaux substrats bio-sourcés en amines correspondantes. Sur les 8 molécules sélectionnées à l'origine, 5 d'entre elles ont pu être converties selon un système en 1P1S, en particulier en utilisant du Au@CaO comme catalyseur pour l'étape d'oxydation. Cependant les rendements sont restés très faibles et ces réactions restent des preuves de concept dans le cadre de cette étude. Afin de contourner cette limitation, un procédé hybride en 1P2S a pu être efficacement mis en œuvre pour la conversion du myrténol en myrténylamine, avec un rendement maximum >95 % en produit formé. Ajoutons que pour cette réaction, deux donneurs d'amines, la (*S*)-méthylbenzylamine et l'*iso*-propylamine, ont montré leur efficacité, pour la conversion quantitative du myrténol. Notons également qu'ayant cherché à minimiser la consommation d'énergie de ce procédé et la présence de sous-produits, l'étape de transamination a été réalisée à température ambiante, et que dans ces conditions, l'enzyme sous forme libre s'est révélée substantiellement plus efficace que sous forme immobilisée. Ce faisant, nous avons ainsi réussi à mettre un point une méthodologie simple, durable et efficace pour la production de la myrténylamine, un synthon jusque-là encore difficilement accessible, mais ayant un fort potentiel de valorisation, et il ne fait aucun doute que cette stratégie pourra également être appliquée aux autres composés listés ici.

Conclusion générale

Le projet HybCat4Bio a eu pour objectif le développement de procédés hybrides 1P2S et 1P1S appliqués à la synthèse de nouvelles molécules aminées. Les réactions étudiées étaient l'oxydation par catalyse hétérogène chimique et le transfert d'amine (ou transamination) catalysée par une transaminase. Ces procédés ont ensuite été appliqués à d'autres composés biosourcés pour la synthèse de nouveaux synthons aminés. Le but global du projet est résumé en Schéma 21.

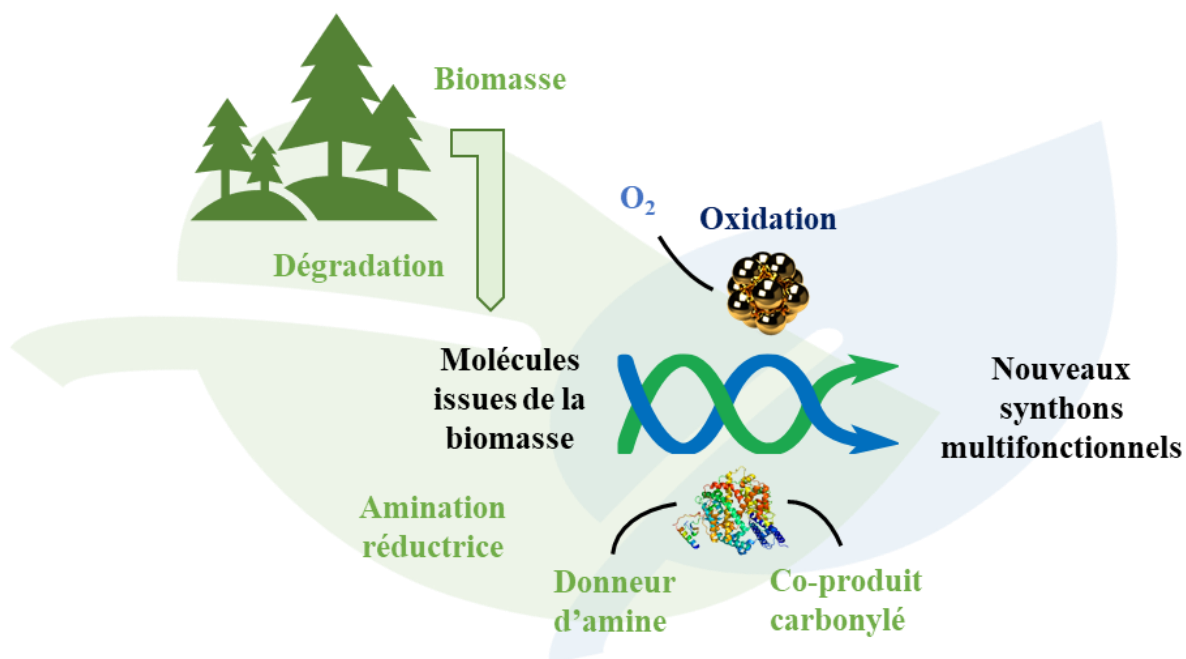


Schéma 21 : Schéma réactionnel général représentant un procédé hybride pour la valorisation directe de molécules issues de la biomasse.

L'étude de la transamination du HMF et de l'AFCA nous a conduit à sélectionner une transaminase et à l'immobiliser par adsorption sur des supports de type EziGTM présentant des polarités variables. Cette méthode d'immobilisation a été réalisée sur des protéines taguées et directement à partir du lysat cellulaire, offrant ainsi une efficacité d'adsorption plus élevée. De plus, elle ne requiert aucun emploi de produits potentiellement toxiques pour l'enzyme ni d'étapes d'activation du support nécessaire dans le cas de l'immobilisation par liaisons covalentes. Ainsi, la Cv-TA (*Chromobacterium violaceum*, Uniprot Acees Number : Q7NWX4) a été sélectionnée puis nous avons déterminé ses propriétés physico-chimiques (thermo- et pH-stabilité).

Au travers d'une première série de catalyseur disponible au laboratoire, nous avons pu effectuer un premier criblage d'oxydation sur le HMFA et sur le HMF. Ce dernier nous a permis

de mettre en lumière des paramètres importants pour l'implémentation de notre procédé hybride. Dans un premier temps le pH joue un rôle essentiel dans les voies réactionnelles. Effectivement, un pH trop bas (>8) favoriserait un mécanisme de désamination oxydative. De plus tous les catalyseurs qui se sont montrés actifs sur le HMFA ont montré une activité de désamination oxydative. Le pH a donc été maintenu à 8 ou moins. Cela a été favorable, car nous avons vu qu'au-delà d'un pH supérieur à 8, la transaminase ne montrait aucun signe d'activité. Le point positif est que, malgré une température de réaction considérée basse pour de la catalyse hétérogène, certains catalyseurs ont montré une activité sur le HMFA. Notamment les catalyseurs C7 et C9 qui ont fourni respectivement 27 et 24 % d'AMFC en 48 h de temps. Cependant la présence d'une réaction de désamination oxydative, baissant le rendement en furfurylamines, ne nous a pas permis de sélectionner cette voie réactionnelle. A l'opposé, nous avons pu identifier un catalyseur capable d'oxyder sélectivement le HMF en AFCA (Pt@SiO₂, 80 % en 24 h).

Nous avons donc développé un procédé hybride « one pot/two steps » (1P2S) combinant l'étape d'oxydation en premier suivi de la transamination dans le même milieu réactionnel. L'optimisation des conditions réactionnelles (40 h d'oxydation à 60 °C) de l'étape d'oxydation nous ont permis de contrôler le rendement (77 %) d'obtention de l'intermédiaire AFCA avant d'ajouter la transaminase vers la conversion en AMFC avec un rendement final de 77 % en AMFC et la production d'un seul sous-produit, le FDCA, qui est lui-même un synthon hautement valorisable.

Après la mise au point de ce premier procédé hybride fonctionnel pour la synthèse de l'AMFC, le projet de thèse s'est naturellement tourné vers la mise au point d'un procédé hybride supérieur : un procédé 1P1S. Cependant au vu des résultats précédents, plusieurs nouvelles problématiques se sont imposées. Premièrement, l'utilisation d'une transaminase thermostable est essentielle pour la mise au point d'un tel procédé. Effectivement, les catalyseurs hétérogènes n'ont montré aucune activité à 30 °C, il faut donc effectuer ce procédé à une température minimum de 50 °C. Dans un second temps, il a fallu trouver un catalyseur hétérogène d'oxydation sélectif du HMFA et qui ne favorise pas le mécanisme de désamination oxydative.

Un procédé hybride « one-pot/one-step » (1P1S) a ensuite été développé. Nous avons obtenu une production finale d'AMFC avec un rendement maximal de 17 %, ce qui représente une première avancée pour cette molécule plate-forme, et une première réalisation pour la catalyse hybride française. Cependant, cette réaction présente une multitude de points

d'amélioration si nous voulons augmenter la quantité d'AMFC finale. Ainsi dans un premier temps une nouvelle série de catalyseurs avec du dépôt d'autres métaux sur une panoplie de supports peut être envisagés. D'autre part, l'ajout d'une pression d'air ou d'oxygène peut être envisagé pour la partie d'oxydation.

Le point final de ce projet est la mise au point d'un matériau multicytalytique hybride combinant des nanoparticules de palladium et la *Bm*-TA (Uniprot Access Number : B9AZ94) co-immobilisée sur un support EziGTMOPAL. Ce catalyseur hybride a permis d'obtenir 8 % d'AMFC (en 48 h de réaction à 50 °C) avec une conversion complète du substrat initial (HMF). Ce catalyseur représente une première avancée vers la mise au point d'une co-immobilisation de transaminases et de nanoparticules métalliques supportées. Au niveau expérimental, deux protocoles innovants ont été mis au point. Dans un premier temps, la mise au point d'une méthode permettant de déterminer l'activité d'un enzyme immobilisé sur support solide a été mise au point via l'utilisation du CARRY UV 3500. Dans un second temps, nous avons su adapter le BLP[®] pour qu'il puisse intégrer le criblage de catalyseur hétérogène d'oxydation en phase liquide avec un prélèvement automatique des milieux réactionnels. C'est notamment la mise au point de cette technique qui nous a permis de réaliser le procédé hybride 1P1S en environ un mois de travail effectif. Pour comparaison en utilisant un système de criblage manuel, il nous a fallu environ un an de travail pour implémenter le procédé hybride 1P2S présenté dans le chapitre 2. De plus, la mise au point de procédé hybride nous a permis de sélectionner une gamme de catalyseur que nous avons testé sur 8 molécules issues de la biomasse. Un substrat est ressorti de ce criblage : le myrténol. Ce dernier a pu être oxydé sélectivement en myrténal en 24 h de réaction à 50°C dans un tampon KH₂PO₄ 100 mM, pH 7.3. L'ajout de la *Bm*-TA@EziGTMOPAL et du donneur d'amine (*S*)-MBA nous a permis de synthétiser la myrténylamine avec un rendement >95 %.

Ce projet de thèse est donc parti d'une idée simple : la transversalité. La combinaison de deux entités normalement incompatible et inapte à fonctionner ensemble. En faisant preuve de compromis et en adaptant les conditions réactionnelles, nous avons monté les différents grades de la catalyse hybride un par un. Tous d'abord la mise au point d'un procédé hybride 1P2S, puis d'un procédé 1P1S et finalement la synthèse d'un MMCHs. Nous avons de plus adapté le procédé hybride 1P2S à une autre molécule.

Une boucle complète a été effectuée. Mon travail personnel sur ce sujet s'arrête ici, mais il ouvre une multitude de possibilités pour la personne qui continuera le projet. En espérant que

la catalyse hybride puisse apporter l'ouverture de nouveaux chemins réactionnelle et faciliter l'accès à un nouveau panel de molécules.

« **Expérimental** »

1 Méthodes analytiques

1.1 Analyses RMN

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à 25 °C à l'aide d'un spectromètre Bruker Advance 300. Les constantes de couplage ont été mesurées en Hertz (Hz) et les multiplicités pour le couplage RMN ^1H ont été présentées comme s (singulet), d (doublet), t (triplet) et m (multiplet). Les déplacements chimiques sont présentés par rapport à une référence : le triméthylsilylpropanoate de sodium deutéré (TSPD₄).

1.2 Analyses HPLC

Les analyses des produits de réaction ont été effectuées sur une HPLC-DAD-MS-LCMS-2020 ultrarapide (Shimadzu, Japon), à l'aide d'une colonne à cartouche Brownlee Spheri-5 RP-18 (4,6 x 250 mm). Des volumes d'injection de 10 µl ont été utilisés pour tous les échantillons. Les phases d'élution de l'eau et de l'acétonitrile contenaient 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA). L'élution a été réalisée à 0,5 ml.min⁻¹, avec une température de four de 30 °C pour la colonne. Le profil d'élution était le suivant : 15 min de phase aqueuse à 100 %, suivi du déplacement progressif de la phase aqueuse vers la phase acétonitrile à 100 % en 2 min. La phase 100 % acétonitrile a été maintenue pendant 2 minutes, puis est passée à nouveau à 100 % phase aqueuse en 2 minutes. La phase à 100 % d'eau a été maintenue jusqu'à la fin de la série, avec une durée totale de 25 minutes, pour équilibrer la colonne et atteindre une pression stable pour l'injection suivante. Les produits ont été détectés à trois longueurs d'onde différentes, à savoir 215, 245 et 280 nm.

1.3 Analyse ICP

L'analyse ICP-OES (spectrométrie d'émission optique à plasma induit par haute fréquence) a été réalisée à l'aide d'un équipement ICP-OES Agilent 720-ES combiné au système de digestion automatisé Vulcan 42 S.

1.4 Analyse TEM

Des images de microscopie électronique à transmission (TEM) ont été enregistrées en plaçant une goutte de la dispersion de la particule dans de l'isopropanol sur un film de carbone

supporté par une grille de cuivre. Le microscope Tecnai de la FEI a été utilisé pour l'enregistrement des images.

1.5 Analyse XPS

L'analyse par spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS) a été réalisée sur un Kratos XPS, Axis UltraDLD «2009» avec un rayonnement monochromatique Al K α (h=1486,6 eV) comme source d'excitation et équipé d'un analyseur hémisphérique haute performance. L'étalonnage des énergies de liaison a été réalisé en utilisant la référence carbone C 1 s à 284,8 eV.

1.6 BET

Environ 100 mg de catalyseur sont introduits dans un tube en verre puis scellés avec un tube en verre plein. Le tube est introduit dans un appareil Vac-prep 061 où le dégazage est fait à température ambiante. L'échantillon est porté à 75 °C pendant 1 h puis à 150 °C pendant 2 h. Un dégazage est ensuite effectué. Le tube contenant l'échantillon est introduit dans un bain d'azote liquide et analysé avec un appareil TRISTAR II plus.

2 Synthèse des catalyseurs :

Les 38 catalyseurs décrits dans le présent document ont été synthétisés à l'aide des quatre approches différentes :

Tableau 23 : Récapitulatif des 38 catalyseurs utilisés pour des réactions d'oxydations en phase liquide.

Code du catalyseur	% Métal	Métal	Support	Procédé
C1	1,13*	Au	Al ₂ O ₃	Réduction-précipitation
C2	1.8 %*	Au	Amberlyst	
C3	1,6*	Au	CaO	
C4	1,6*	Au _{PVA}	CaO	Sol immobilisation
C5	6,87*	Au	CeO ₂	
C6	1,8*	Au	MgO	
C7	1.7 %	Pd	Al ₂ O ₃	Réduction-précipitation
C8	0,9*	Pd	TiO ₂	Sol immobilisation
C9	6.3 %*	Pt	SiO ₂	
C10	1,5*	Ru	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Imprégnation humide
C11	0.9 %-0,1 %**	Au-Pd	TiO ₂	Sol immobilisation
C12	0.3 -0,7**	Au-Pd	ZrO ₂	
C13	0.8-0,8**	Au-Pt	TiO ₂	
C14	0.7 -0,8**	Pt-Pd	Al ₂ O ₃	Co-précipitation
C15	1.0-1,0**	Pt-Pd	TiO ₂	
C16	5,6*	Au	OPAL	Imprégnation humide à l'excès du solvant
C17	1**	Ru	SiO ₂	Sol immobilisation
C18	5**	Ru	SiO ₂	

HybCat4Bio – Expérimental

C19	2**	Au	Fe ₃ O ₄
C20	2**	Pd	Fe ₃ O ₄
C21	2**	Pd	Fe ₃ O ₄
C22	1,92*	Au	CeO ₂
C23	0,61*	Au	SiO ₂
C24	2**	Au	UiO-66_NH ₂
C26	2**	Pd	CN
C27	2**	Ir	CN
C28	2**	Pt	CN
C29	1.41*	Pd	OPAL
C30	0.83*	Pt	OPAL
C31	1.80*	Au	TiO ₂
C32	0,49*	Au	MgO
C33	0,09*	Au	ZrO ₂
C34	1,57*	Pd	MgO
C35	0,95*	Pd	TiO ₂
C36	0.16-0.5*	Au-Pd	TiO ₂
C37	0.32-0,17*	Au-Pd	TiO ₂
C38	0.43-0,13*	Au-Pd	TiO ₂

*déterminée par ICP**valeurs nominales

2.1 Réduction-précipitation (C1, C7)

La réduction chimique du catalyseur à l'hydrazine a été réalisée dans de l'eau déionisée dans un ballon de réaction à trois cols de 110 cm³ immergé dans un bain d'eau thermostatique. Le ballon de réaction était équipé d'un condenseur à reflux et d'un thermocouple pour contrôler la température de la réaction. Une suspension du précurseur de l'or (acide tétrachloroaurique (III), Sigma Aldrich, <99 %) et du support (1 g d'Al₂O₃ dans 60 cm³ d'eau distillée) a été agitée pendant 30 min à température ambiante. Le mélange réactionnel a ensuite été chauffé lentement de 25 °C à 50 °C et 2 ml d'hydrazine aqueuse à 80 % (Sigma Aldrich, <99 %) ont ensuite été ajoutés (rapport N₂H₄/H₂O : 0,3/5). Le pH de la solution était de 12 et est resté presque constant. La réaction était terminée après 1 h. Après réduction, le solide a été filtré, lavé à l'eau distillée et séché à l'air à 100 °C pendant 16 h. La charge finale d'au a été déterminée par spectroscopie d'émission à plasma optique inductif (ICP) (720-ES ICP-OES, Agilent, USA) avec visualisation axiale et détection CCD simultané.

2.2 Immobilisation « sol-gel » (C2, C3, C4, C5, C6, C8, C11, C12, C23-C35))

Une solution à 2 % en poids de PVA a été ajoutée à une solution aqueuse de HAuCl₄ (5,08-10⁻⁴ M) sous agitation vigoureuse [PVA/Au (p/p) = 1,2]. Une solution de NaBH₄ fraîchement préparée à 0,1 M [NaBH₄/Au (mol/mol) = 5] a ensuite été ajoutée pour former un sol métallique rouge clair (Au). Après 30 minutes de génération du sol, le colloïde a été immobilisé en ajoutant le support (MgO, CaO, TiO₂, CeO₂, ZrO₂, et Amberlyst) sous agitation vigoureuse. La quantité de support a été calculée pour donner une charge métallique finale totale de 2 % en poids (nominal). Après 2 h, la solution a été filtrée et le solide a été lavé à l'eau chaude (2 x 25 ml, 70 °C) et à l'éthanol (2 x 25 ml) avant de sécher à 100 °C pendant 1 h. La charge métallique finale a été déterminée par analyse ICP.

2.3 Imprégnation humide (C9, C10, C20, C21, C22)

a. Pt/SiO₂ :

Les quantités appropriées de Pt (NH₃)₄Cl₂ et de Pt (NH₃)₄(OH)₂ (rapport 1 : 1) ont été dissoutes dans de l'eau déionisée. De la silice (Degussa ; surface spécifique, 203 m². g⁻¹) a ensuite été ajoutée et le pH du mélange de réactif a été maintenu à 8,9. Le mélange a été mélangé pendant 1 h à température ambiante, filtré et lavé à l'eau chaude pour éliminer tous les ions Cl⁻. Le solide

a ensuite été séché à 105 °C pendant 2 h et réduit avec de l'hydrogène pur à 420 °C pendant 4 h ($2\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ et $50\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$). La charge finale de Pt était de 6,3 %, comme déterminé par l'analyse ICP

b. Ru/HAP :

Une quantité appropriée de Ru (acac) 3 (acac, acétylacétinate ; Sigma Aldrich <99 %) a été mélangée avec de l'HAP (1 g) dans de l'eau (50 ml) pendant 1 h à la température ambiante. Ensuite, le mélange de réactifs a été évaporé sur un évaporateur rotatif pendant 1 h. Le solide obtenu a été calciné à 400 °C pendant 4 h ($4\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$) et la quantité de Ru a ensuite été déterminée par analyse ICP.

2.4 Coprécipitation (C13, C14, C15)

Des quantités appropriées de solutions de précurseurs d' Au (HAuCl_4), Pt ($\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$) et Pd (PdCl_2) ont été ajoutés goutte à goutte aux solutions aqueuses du support (1 g dans 50 cm^3 d'eau) et les mélanges de réactifs ont été agités à température ambiante pendant 1 h. Ensuite, une solution aqueuse de NaOH a été ajoutée pour atteindre un pH de 9. Enfin, le solide a été récupéré par filtration, lavé à l'eau et séché à 100 °C pendant la nuit. Les solides sont réduits avec de l'hydrogène pur à 300 °C pendant 4 h ($2\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ et $50\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$).

3 Production des transaminases

3.1 Production de la Q7NWX4, Q9A3Q9 et A9CVQ7

Les transaminases de *Chromobacterium violaceum* (Cv-TA, UniProt acc. num. : Q7NWX4), *Caulobacter vibrioides* (CaV-TA, UniProt acc. Num : Q9A3Q9) et la transaminase A9CVQ7 (UniProt acc. Num) ont été clonées dans un plasmide pET-22b⁽⁺⁾ et transformées dans une souche *Escherichia coli* BL21 (DE3). Elles ont été fournies sous forme de colonies isolées sur un bouillon LB complété par 100 µg. ml⁻¹ ampicilline sur une boîte de pétrie par le professeur Thierry Gefflaut, ICCF, Clermont-Ferrand, France. Ces enzymes ont été marquées avec un marqueur 6x-His à leurs extrémités N-terminale. Les clones originaux ont été créés par le professeur Véronique De Berardinis, Genoscope, Evry, France. Une colonie a été prélevée et introduite dans un flacon de 15 ml contenant 5 ml de bouillon LB stérile complété par 100 µg. ml⁻¹ ampicilline. Elles ont ensuite été incubées pendant la nuit (16 h) à 37 °C avec une agitation de 200 rpm. Exactement 3 ml de ce pré inoculum ont ensuite été introduits dans 150 ml de bouillon LB frais complété par 100 µg. ml⁻¹ ampicilline. La culture a été incubée à 37 °C sous agitation à 200 rpm pendant 5 h, puis complétée avec 0,5 mM d'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) pour induire une surexpression enzymatique. La culture a été maintenue à 30 °C pendant la nuit (16 h) sous agitation à 200 rpm, puis centrifugée à 4 000 g pendant 10 min. Ensuite, le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé deux fois avec un tampon au phosphate de sodium (40 ml, pH 7,0, 10 mM). L'échantillon a été centrifugé à 4 000 g pendant 10 min après chaque étape de lavage et le surnageant a été éliminé. Le culot résultant a ensuite été remis en suspension dans un tampon de lyse au phosphate de sodium (5 ml, pH 7,0, 10 mM ; 50 µM pyridoxal phosphate). Les cellules ont été explosées avec une presse française (FP) à 2,4 bars et le lysat a ensuite été centrifugé à 16 000 g pendant 2 min pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été récupéré et stocké à -80 °C avant la lyophilisation. La concentration en protéines de l'EFC a été dosée selon la méthode de Bradford et a été déterminée comme ~10 mg.ml⁻¹ de protéines pour chaque lot de production d'enzyme. La lyophilisation, qui a été effectuée à température ambiante sous une pression de 25 mBar, a permis d'obtenir une poudre blanche.

3.2 Production de la B9AZ94, I2IXB4, D1C7Z3, A0KE01 et Q5LMU1

Les transaminases *Burkholderia multivorans* (Bm-TA, UniProt acc. Num : B9AZ94), *Burkholderia sp* (Bu-TA, UniProt acc. Num : I2IXB4) *Sphaerobacter thermophilus* (St-TA, UniProt acc. Num : D1C7Z3), A0KE01 et *Ruegeria pomeroyi* (Rp-TA, UniProt acc. Num : Q5LMU1) ont été reçues dans un plasmide pET-24b et pET-22a pour la B9AZ94. Le plasmide pET-24b contient un gène de résistance à l'ampicilline tandis que plasmide pET-22a contient un gène de résistance à la kanamycine. Elles ont ensuite été clonées et transformées dans une souche *Escherichia coli* BL21 (DE3). Ces enzymes ont été marquées avec un marqueur 6x-His à leurs extrémités N-terminale. Une colonie a été prélevée et introduite dans un flacon de 15 ml contenant 5 ml de bouillon LB stérile (ou TB) complété par 100 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ ampicilline (ou kanamycine). Elle a ensuite été incubée pendant la nuit (16 h) à 37 °C avec une agitation de 200 rpm. Exactement 3 ml de ce pré inoculum ont ensuite été introduits dans 150 ml de bouillon LB frais (ou TB) complétés par 100 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ ampicilline (ou kanamycine). La culture a été incubée à 37 °C sous agitation à 200 tr/min pendant 5 h, puis complétée avec 0,5 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) (ou 1 mM) pour induire une surexpression enzymatique. La culture a été maintenue à 25 °C pendant la nuit (16 h) sous agitation à 200 rpm, puis centrifugée à 4 000 g pendant 10 min. Ensuite, le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé deux fois avec un tampon au phosphate de sodium (40 ml, pH 7,0, 10 mM). L'échantillon a été centrifugé à 4 000 g pendant 10 min après chaque étape de lavage et le surnageant a été éliminé. Le culot résultant a ensuite été remis en suspension dans un tampon de lyse au phosphate de sodium (5 ml, pH 7,0, 10 mM ; 50 μM pyridoxal phosphate). Les cellules ont été explosées avec une presse française (FP) à 2,4 bars et le lysat a ensuite été centrifugé à 16 000 g pendant 2 min pour éliminer les débris cellulaires. Les lysats obtenus sont dosés par réactifs de Bradford pour obtenir une concentration d'environ 8 mg.ml^{-1} . Ils sont conservés à 4 °C avant purification.

3.3 Purification de la B9AZ94

Une purification douce est effectuée sur une colonne IMAC (cellu sep H11). Une colonne de 20 ml est coulée pour une capacité totale de fixation de 800 mg d'enzymes (40 mg.ml^{-1} de colonne mouillée). Le suivi de purification est effectué via dosage de Bradford. 5 μl de chaque fraction récoltée est prélevée et ajoutée à 195 μl de réactifs de Bradford en plaques 96 puits à

fond plat. La colonne est équilibrée avec deux volumes colonnes de solution 1. Le lysat cellulaire est ensuite déposé et environ deux volumes colonnes de solution 1 sont passées jusqu'à disparition de la coloration bleue (signe que les enzymes constitutives d'*E. coli* sont passées au travers de la colonne) et réapparition de la coloration naturelle du Bradford. Environ 2,5 volumes colonnes de solution 2 sont ensuite passées jusqu'à récupération de la totalité de l'enzyme purifiée (fin de la deuxième coloration bleue). Les fractions contenant l'enzyme purifiée sont réunies et dialysées deux fois. La première fois dans un tampon KH_2PO_4 10 mM pH 7.0 et la deuxième fois dans tampon KH_2PO_4 10 mM pH 7,0 contenant 3 M de sulfate d'ammonium.

Tableau 24 : Composition des solutions 1 et 2 utilisées pour la purification enzymatique.

	Solution 1	Solution 2
Imidazole (mM)	25	250
Tampon KH_2PO_4 (mM)	50	50
pH	7	7
KCl (mM)	50	300

4 Activité enzymatique

4.1 Tests d'activités au spectrophotomètre UV-Visible

a. Activités enzymatiques déterminées via un test à la LDH

Toutes les analyses ont été effectuées en triplicata. Les réactions ont été réalisées à l'échelle de 200 μ l dans une plaque 96 puits à fond plat en utilisant un tampon de phosphate de sodium 100 mM (pH approprié) contenant 2 mM de substrat, 5 U. ml⁻¹ LDH, 0,5 mg.ml⁻¹ NADH, 0,1 mM PLP, 0,1 mg.ml⁻¹ Cv-TA CFE, et 10 mM L-alanine. La cinétique a été suivie par spectrophotométrie à 340 nm à 30 °C pendant 20 min. Comme décrit dans le système de mesure international, l'activité enzymatique de 1 UI correspondait à 1 μ mol de substrat transformé par minute. Le trajet optique de la plaque 96 puits, remplis de 200 μ l d'eau, a été estimé à 0,59 cm.

b. Activités enzymatiques déterminées via un test à la (S)-MBA

Toutes les analyses ont été effectuées en triplicata. Les réactions ont été réalisées à l'échelle de 200 μ l une plaque 96 puits à fond plat, en utilisant un tampon de phosphate de sodium 100 mM (pH approprié) contenant 1,6 mM de substrat, 1,6 mM de (S)-MBA, et 0,4 mM de PLP (solution mère). 20 μ l d'enzyme à la concentration désiré sont ajoutés à 50 μ l de la solution mère. Le puits est complété avec 130 μ l d'eau. L'activité enzymatique est déterminée par rapport à l'augmentation de la concentration en acétophénone suivie à 245 nm.

c. Activités enzymatiques déterminées via un test à l'IPA

Toutes les analyses ont été effectuées en triplicata. Les réactions ont été réalisées à l'échelle de 200 μ l dans une plaque 96 puits à fond plat, en utilisant un tampon de phosphate de sodium 100 mM (pH approprié) contenant 1,6 mM de substrat, 16 mM d'IPA et 0,4 mM de PLP (solution mère). 20 μ l d'enzyme à la concentration désiré sont ajoutés à 50 μ l de la solution mère. Le puits est complété avec 130 μ l d'eau. L'activité enzymatique est déterminée par rapport à la diminution de la concentration en HMF à 280 nm.

5 Études des paramètres de l'enzyme immobilisée

5.1 *Transaminases immobilisées (Cv-TA)*

a. Sélection du support d'immobilisation (Cv-TA)

EziG™ OPAL, CORAL, et AMBER (EnginZyme, Suède) ont été testés comme supports d'immobilisation pour la Cv-TA. Six rapports différents (p/p 1 : 1, 1 : 3, 1 : 6, 1 : 9, 1 : 12, 1 : 15) ont été testés. Ainsi, la quantité appropriée de chaque support a été mise en suspension dans 1 ml de tampon au phosphate de sodium 100 mM (pH 8), contenant 1 mg.ml⁻¹ Cv-TA (CFE) et 1 mM de PLP. Les mélanges ont été incubés pendant 1 h à 25 °C sur un agitateur rotatif (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) à 22 rpm. Les mélanges ont ensuite été centrifugés à 16 000 g pendant 1 min et 15 µl du surnageant sont prélevés afin d'effectuer une analyse Bradford. La concentration de protéines dans le surnageant a été déterminée par spectrophotométrie à 595 nm sur une gamme d'étalonnage de BSA (0 à 1 mg.ml⁻¹).

b. Cinétique du pourcentage d'immobilisation (Cv-TA)

EziG™ OPAL, CORAL, et AMBER (EnginZyme, Suède) ont été testés comme supports d'immobilisation pour le Cv-TA. Ainsi, 3 mg de chaque support a été mis en suspension dans 1 ml de tampon au phosphate de sodium 100 mM (pH 8), contenant 1 mg.ml⁻¹ Cv-TA (CFE) et 1 mM de PLP. Les mélanges ont été incubés pendant 3 h à 25 °C sur un agitateur rotatif (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) à 22 rpm. 15 µl du surnageant sont prélevés à 15, 30, 45, 60, 120 et 180 min et stockés dans de la glace avant d'être analysés plus en détail. La concentration de protéines dans le surnageant aux différents moments a été déterminée par spectrophotométrie à 595 nm dans une gamme de calibrage de BSA (0 à 1 mg.ml⁻¹).

c. Réaction de transamination avec les enzymes immobilisées (Cv-TA)

Un échantillon de mélange réactionnel de 1 ml contenant 10 mM d'AFCA (ou HMF), 100 mM de NaH₂PO₄ d'IPA (10 et 1000) et 1 mM de PLP dans de l'eau ultra-pure ont été ajustés à un pH de 8 à l'aide d'une solution concentrée de NaOH. Ensuite, 1 mg de CFE lyophilisé ou 1 mg.ml⁻¹ de CFE immobilisé sur 3 mg d'OPAL (selon la procédure générale) sont introduits dans le milieu et le mélange réactionnel est incubé pendant 4 h à 25 °C. Le processus de formation du produit a été suivi par HPLC-DAD à 245 et 280 nm.

d. Recyclage de la transaminase immobilisée (Cv-TA)

La transaminase a été immobilisée selon la procédure générale puis dans un échantillon de mélange réactionnel de 1 ml contenant 10 mM d'AFCA, 100 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de (S) - α -méthylbenzylamine et 1 mM de PLP dans de l'eau ultrapure. Le mélange a été incubé pendant 5 h à 25 °C sur un agitateur rotatif (Tube Revolver, Thermoscientific, USA). Des échantillons de 50 μ l ont été prélevés à 30, 60, 120, 180, 240 et 300 min afin de suivre la réaction par HPLC-DAD à 245 et 280 nm. Une fois la réaction terminée, le mélange a été centrifugé à 16 000 g pendant 1 min et le surnageant est éliminé. Une solution fraîche de 10 mM d'AFCA a ensuite été ajoutée à l'Eppendorf contenant la transaminase immobilisée. Le cycle suivant a été suivi comme décrit précédemment. 3 cycles ont été effectués de cette façon. La transaminase a été stockée à 4 °C entre les cycles 1 et 2.

5.2 Stabilité thermique de la Cv-TA

La stabilité thermique de la Cv-TA a été testée à 30 et 60 °C. Les réactions ont été mises en œuvre à l'échelle de 1 ml, en utilisant un tampon de phosphate de sodium 100 mM (pH 8) contenant 4 mM d'AFCA, 1 mM de PLP, 25 mM de L-alanine et 0,1 mg.ml⁻¹ Cv-TA (CFE). Les réactions ont été incubées sur un bain sec à 30 et 60 °C et des aliquotes de 20 μ l ont été recueillies après 10, 20, 30, 60 et 90 minutes. Ensuite, 20 μ l de 50 U. ml⁻¹ LDH + 0,5 mg.ml⁻¹ NADH et 160 μ l de tampon au phosphate de sodium 100 mM (pH 8) ont été ajoutés à chaque aliquote après refroidissement à température ambiante. La conversion du NADH a été suivie par spectrophotométrie à 340 nm à 30 °C.

5.3 Activité de la Cv-TA@EziGTM

EziGTM OPAL, CORAL, et AMBER (EnginZyme, Suède) ont été testés comme supports d'immobilisation pour le Cv-TA. Ainsi, 1,5 mg de chaque support a été mis en suspension dans 1 ml de tampon au phosphate de sodium 100 mM (pH 8) contenant 0,5 mg.ml⁻¹ de Cv-TA CFE et 1 mM de PLP. Les mélanges ont été incubés pendant 1 h à 25 °C sur un agitateur rotatif (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) à 22 rpm. Les mélanges ont ensuite été centrifugés à 16 000 g pendant 1 min et les surnageants ont été éliminés. Les billes (1 ml) ont été remises en suspension dans un tampon de phosphate de sodium 100 mM (pH 8) contenant 0,1 mM de PLP, 4 mM d'AFCA, et 25 mM de L-alanine. Les mélanges réactionnels ont été incubés pendant 90 minutes à 30 °C sur un agitateur rotatif (Thermoscientific, USA) à 22 rpm.

Ensuite, des aliquotes de 20 μl ont été collectées après 10, 20, 30, 60 et 90 min, auxquelles ont été ajoutés 20 μl de 50 U. ml^{-1} LDH + 0,5 mg. ml^{-1} NADH et 160 μl de tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 8) après refroidissement à température ambiante. La disparition du NADH a été suivie par spectrophotométrie à 340 nm à 30 °C.

5.4 Immobilisation de la Cv-TA@EziGTMOPAL pour la synthèse

Pour les réactions hybrides, la Cv-TA (CFE) a été immobilisé sur le support EziGTMOPAL (EnginZyme, Suède). Ainsi, 3 mg d'EziGTMOPAL ont été mis en suspension dans 1 ml de tampon au phosphate de sodium 100 mM (pH 8) contenant 1 mg. ml^{-1} de Cv-TA CFE et 1 mM de PLP. Le mélange a été incubé pendant 1 h à 25 °C sur un agitateur rotatif (Thermoscientific, États-Unis) à 22 rpm. Le mélange a ensuite été centrifugé à 16 000 g pendant 1 min et le surnageant résultant a été éliminé. Les billes de Cv-TA@EziGTMOPAL ont été immédiatement utilisées dans la réaction de synthèse pour limiter la dénaturation des enzymes.

6 Études enzymatiques au CARRY UV 3500

6.1 Activités enzymatiques déterminées via un test à la (S)-MBA

Les réactions ont été réalisées à l'échelle de 2000 μl dans des cuves en quartz, en utilisant un tampon de phosphate de sodium 100 mM (pH approprié) contenant 1,6 mM de substrat, 1,6 mM de (S)-MBA, et 0,4 mM de PLP (solution mère). 200 μl d'enzyme à la concentration désiré sont ajouté à 500 μl de la solution mère. Le puits est complété avec 1300 μl d'eau. L'activité enzymatique est déterminée par rapport à l'augmentation de la concentration en acétophénone suivie à 245 nm.

6.2 Immobilisation de la Bm-TA

EziG™ OPAL, CORAL, et AMBER (EnginZyme, Suède) ont été testés comme supports d'immobilisation pour le Bm-TA. Trois rapports différents (p/p 1 :5, 1 :10, 1 :15) ont été testés. Ainsi, la quantité appropriée de support de chaque support ont été mis en suspension dans 1 mL de tampon au phosphate de potassium 100 mM (pH 7.3), contenant 0.2 mg.ml⁻¹ de Bm-TA pure et 1 mM PLP. Les mélanges ont été incubés pendant 1 h à 25 °C sur un agitateur rotatif (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) à 22 rpm. Un suivi cinétique d'immobilisation est effectué en parallèle et 15 μl de surnageant sont prélevés toutes les 15 min pendant 60 min et dosé par réactifs de Bradford. Les mélanges ont ensuite été centrifugés à 16 000 g pendant 1 min et 15 μl du surnageant sont prélevés afin d'effectuer une analyse Bradford. La concentration de protéines dans le surnageant a été déterminée par spectrophotométrie à 595 nm sur une gamme d'étalonnage de BSA (0 à 1 mg.ml⁻¹).

6.3 Activités de l'enzyme immobilisée

L'utilisation du CARRY UV 3500 nous a permis de mettre au point une méthode de mesures d'activités enzymatiques directe.

a. Protocole général

L'enzyme est immobilisé selon le paragraphe 6.2 avec un rapport de 1 : 5 (p/p ; 200 μg de Bm-TA pur sont immobilisés sur 1 mg de support OPAL. Dans une cuve de 2 ml, 500 μl d'une solution mère contenant 1,6 mM de substrat, 1,6 mM de (S)-MBA, et 0,4 mM de PLP sont

ajoutés et complétés avec 1500 μ l d'eau ultrapur. Une agitation de 400 rpm est mise et l'activité est mesurée via la mesure de l'augmentation de l'absorbance de l'acétophénone à 245 nm.

b. pH stabilité

La pH stabilité de la *Bm*-TA est mesurée via le test mis au point dans le paragraphe 6.1 sur une gamme de pH allant de 5,5 à 8 avec un pas de 0,5. Un tampon citrate 100 mM est effectué pour les pH 5.5 et 6. Un tampon KH_2PO_4 100 mM est utilisé pour les pH 6 à 8. Un tampon TRIS est utilisé pour le pH 8.

c. Activité thermique

L'activité thermique de la *Bm*-TA est mesurée via le test mis au point dans le paragraphe 6.1 sur une gamme de température allant de 15 à 85 °C avec un pas de 5 °C. La thermo activité de la *Bm*-TA@EziGTMOPAL est mesurée via le test mis au point dans le paragraphe a sur une gamme de température allant de 15 à 85 °C avec un pas de 5 °C.

d. Stabilité thermique

La stabilité thermique de la *Bm*-TA et *Bm*-TA@EziGTMOPAL a été mesurée sur 48 h via la mesure d'activité décrite dans le paragraphe 6.1 respectivement. 200 μ g de *Bm*-TA ou 200 μ g immobilisés sur un support EziGTM@OPAL (dans une solution tampon KH_2PO_4 100 mM pH 7.3 contenant 1 mM de PLP) sont incubés sur une gamme de température allant de 30 à 60 °C avec un pas de 5 °C.

7 Synthèse des produits de référence

7.1 5- Hydroxyméthylfurfurylamine (HMFA)

Un mélange réactionnel de 10 ml contenant 10 mM de HMF, 100 mM de phosphate de sodium, 10 mM de (*S*)- α -méthylbenzylamine et 1 mM de phosphate de pyridoxal dans de l'eau ultrapure a été ajusté à un pH de 8 en utilisant une solution concentrée d'hydroxyde de sodium. Ensuite, 10 mg de Cv-TA (CFE lyophilisé) ont été ajoutés et le mélange réactionnel a été incubé pendant 4 h à 25 °C. La formation du produit a été suivie par RMN ¹H. Une fois la réaction terminée, le produit a été obtenu par purification sur résine échangeuse d'ions comme décrits dans les procédures générales (CCM : Rf = 0,79/éluant : 0,1 M ammoniac dans l'eau distillée). Après séchage, le produit a été récupéré avec un rendement >99 % sous la forme d'une poudre brun jaunâtre.

7.2 5- Aminométhyl-2-furancarboxaldéhyde (AMFA)

Un échantillon de 4 ml de mélange réactionnel contenant 10 mM de DCAF, 100 mM de phosphate de sodium, 10 mM de (*S*)- α -méthylbenzylamine et 1 mM de phosphate de pyridoxal dans de l'eau ultrapure a été ajusté à un pH de 8 à l'aide d'une solution concentrée de NaOH. Ensuite, 4 mg de Cv-TA (CFE) lyophilisés ont été ajoutés et le mélange réactionnel a été incubé pendant 2 h à 25 °C. Le processus de formation du produit a été suivi par HPLC-DAD et RMN ¹H pendant 2 h. Le produit n'a pas pu être purifié sur résine échangeuse d'ions (CCM : Rf = 0,94/éluant : 0,1 M d'ammoniac dans l'eau distillée).

7.3 Acide 5-aminométhyl-2-furannecarboxylique (AMFC)

Un échantillon de 10 ml de mélange réactionnel contenant 10 mM 4a, 100 mM de dihydrogénophosphate de sodium, 10 mM de (*S*)- α -méthylbenzylamine et 1 mM de phosphate de pyridoxal dans de l'eau ultra-pure a été ajusté à un pH de 8 à l'aide d'une solution concentrée d'hydroxyde de sodium. Ensuite, 10 mg de CFE lyophilisé ont été ajoutés et le mélange réactionnel a été incubé pendant 4 h à 25 °C. Le processus de formation du produit a été suivi par RMN ¹H. Une fois la réaction terminée, le produit a été obtenu par purification sur résine échangeuse d'ions comme décrits dans les procédures générales (CCM : Rf = 0,85/éluant : 0,1 M ammoniac dans l'eau distillée). Après séchage, le produit a été récupéré sous forme de poudre jaune avec un rendement supérieur à 99 %

7.4 Purification des produits de réaction

Tous les produits aminés ont été purifiés sur une résine échangeuse d'ions DOWEX 50WX8 100-200 mesh avec un rapport de 0,1 mM de produit pour 20 ml de résine. La résine a d'abord été lavée avec de l'eau ultrapure jusqu'à l'obtention d'un pH neutre. Le mélange réactionnel a ensuite été déposé directement sur la résine et lavé avec quatre volumes d'eau ultrapure. L'élution a été initiée avec une solution d'ammonium 0,1 M dans de l'eau ultrapure jusqu'à ce qu'un pH basique soit atteint. L'élution du produit a ensuite été complétée avec un gradient de solution d'ammonium (0.2, 0.4, 0.5 et 1M) dans de l'eau ultrapure. L'élution du produit, qui a été suivie sur la CCM avec une solution d'ammonium 0,1 M dans de l'eau distillée comme éluant, a été révélée, à l'aide de ninhydrine, sous la forme d'une tache jaune-brun. Toutes les fractions contenant le produit ont été rassemblées et évaporées à l'aide d'un concentrateur MiVac Quattro (Sp Scientific, Royaume-Uni) sous 25 mBar à 35 °C.

L'AMFC a pu être récupéré directement après 20 ml de volume de lavage. Son élution a été suivie sur CCM avec une solution d'ammonium 0,1 M dans de l'eau distillée comme éluant, et le produit a été révélé en utilisant une lampe UV à 254 nm. Toutes les fractions contenant le produit ont été rassemblées. Pour garantir l'absence de sels, la solution contenant l'AMFC (10 ml) a d'abord été acidifiée à pH 1 en utilisant quelques gouttes de HCl concentré et extraite en utilisant 3 fois 20 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique a finalement été évaporée à l'aide d'un concentrateur MiVac Quattro (Sp Scientific, Royaume-Uni) sous 25 mBar à 35 °C.

8 Criblage manuel

8.1 Criblage de catalyseurs pour l'oxydation du 5-hydroxyméthylfurfural

L'oxydation du HMF a été réalisée dans un flacon de GC de 2 ml. Ainsi, 2 mg de catalyseur solide ont été ajoutés à 1 ml d'une solution de HMF de 10 mM dans un tampon de phosphate de sodium de 100 mM (pH 8) dans de l'eau ultrapure. Les flacons ont été incubés à 60 °C à l'étuve et agités à l'aide d'un agitateur rotatif (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) à 22 rpm, avec un angle de 45° par rapport à l'axe de rotation pour maintenir une bonne homogénéité dans les mélanges réactionnels comprenant les catalyseurs solides hétérogènes. Au total, 15 catalyseurs différents ont été testés comme décrits dans le tableau 1. Une réaction à blanc a été réalisée sans ajout de catalyseur. Pour suivre le processus de formation du produit, une aliquote de 50 µl a été prélevée après 24 h et analysée par HPLC-DAD comme décrit dans les procédures générales.

8.2 Criblage de catalyseurs pour l'oxydation du HMFA

L'oxydation du HMFA a été réalisée dans un flacon de GC de 2 ml. Ainsi, 4 mg de catalyseur solide ont été ajoutés à 1 ml d'une solution de HMFA de 10 mM dans un tampon de phosphate de potassium 100 mM (pH 7.3) dans de l'eau ultra-pure. Les flacons ont été incubés à 50 °C dans une étuve et agités à l'aide d'un agitateur rotatif (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) à 25 rpm, avec un angle de 45° par rapport à l'axe de rotation pour maintenir une bonne homogénéité dans les mélanges réactionnels comprenant les catalyseurs solides hétérogènes. Au total, 33 catalyseurs différents ont été testés. Une réaction à blanc a été réalisée sans ajout de catalyseur. Pour suivre le processus de formation du produit, une aliquote de 50 µl a été prélevée après 48 h et analysée par HPLC-DAD comme décrit dans les procédures générales.

8.3 Criblage de catalyseurs pour l'oxydation de molécules issues de la biomasse

L'oxydation des molécules issues de la biomasse a été réalisée dans un flacon de GC de 2 ml. Ainsi, 4 mg de catalyseur solide ont été ajoutés à 1 ml d'une solution de substrats de 10 mM dans un tampon de phosphate de potassium 100 mM (pH 7.3) dans de l'eau ultra-pure. Les flacons ont été incubés à 50 °C dans une étuve et agités à l'aide d'un agitateur rotatif (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) à 25 rpm, avec un angle de 45° par rapport à l'axe de rotation pour maintenir une bonne homogénéité dans les mélanges réactionnels comprenant les catalyseurs solides hétérogènes. Au total, 4 catalyseurs différents ont été testés. Une réaction à blanc a été réalisée sans ajout de catalyseur. Pour suivre le processus de formation du produit, une aliquote de 50 µl a été prélevée après 48 h et analysée par HPLC-DAD comme décrit dans les procédures générales. Le milieu réactionnel brut est analysé par RMN ¹H (D₂O, 300 MHz).

9 Criblage automatisé

Le criblage automatisé s'est mis au point via l'utilisation de l'appareil BioLectorPro[®]. 1 ml d'une solution mère contenant 10 mM du substrat désiré, 10 mM de (*S*)-MBA, 1 mM de PLP dans un tampon KH₂PO₄ 100 mM pH 7.3 est introduite dans chacun des 48 puits d'une Flower Plate (FP). La quantité appropriée de catalyseur hétérogène d'oxydation (1, 2, 4 ou 8 mg) est rajoutée au milieu avec la quantité désirée de *Bm*-TA@EziG[™]OPAL (O1, O2 ou O3). La plaque est scellée à l'aide d'un film de silicone puis d'un film transparent pour limiter l'évaporation du milieu réactionnel. Des ouvertures sont pratiquées au-dessus des réacteurs pour aider au futur prélèvement. La plaque est introduite dans le BioLectorPro[®] et mise à agiter à 400 rpm sous 50 °C. 30 µ de prélèvements sont effectués toutes les 8 h et sont introduits dans une plaque à fond en V préalablement scellés avec un film. La plaque servant au prélèvement est conservée à 4 °C. Avant chaque prélèvement un temps de latence de 180 s est observé afin de permettre au catalyseur hétérogène de décanter dans le fond du puits et éviter tout problème de bouchage des seringues. Les plaques 96 puits à fond en v sont stockés et conservés à -20 °C avant d'être analysés par HPLC-DAD.

10 Réaction « one-pot/two-steps » : conversion du HMF en AMFC

La réaction en un ou deux temps a été réalisée dans un flacon de 20 ml. Ainsi, 20 mg de catalyseur solide ont été ajoutés à 10 ml d'une solution 1a de 10 mM dans un tampon aqueux de phosphate de sodium de 100 mM à pH 8. Le mélange réactionnel a été incubé à 60 °C dans un four et agité à l'aide d'un agitateur rotatif (Thermoscientific, USA) à 22 rpm. Des aliquotes (50 µL) ont été prélevées après 0, 15, 24, 40 et 44 h et la formation de produits d'oxydation a été confirmée par HPLC-DAD. Le mélange réactionnel a été refroidi à température ambiante (25 °C) après 64 h et 10 mg de Cv-TA@EziGTM OPAL ont ensuite été ajoutés à la solution avec 1 ml de 100 mM (S)- α -méthylbenzylamine ou 1 ml de solution 1 M IPA et 500 µM dans de l'eau ultra-pure à pH 8. Le mélange réactionnel a été incubé à température ambiante (25 °C) pendant 4 h. La formation de produit a été confirmée par HPLC-DAD comme décrite dans la procédure générale après la fin de la réaction. Le mélange réactionnel a également été analysé par RMN ¹H pour valider la conversion complète de AFCA en AMFC. Après un total de 68 h de réaction, les catalyseurs ont été éliminés par centrifugation (4 000 g, 1 min) et les produits de la réaction ont été purifiés sur une résine échangeuse d'ions comme décrits dans les procédures générales. L'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique a été récupéré sous forme de poudre jaunâtre, avec un rendement de 50 %, et caractérisé par RMN (¹H, ¹³C, et HSQC) et HPLC. Parallèlement à la synthèse, une réaction à blanc a été effectuée dans les mêmes conditions, mais en l'absence du catalyseur Pt/SiO₂. La deuxième étape a été lancée après une oxydation de 40 h à 60 °C. L'absence d'oxydation du HMF a été suivie par HPLC-DAD après 0, 15, 24, 40 et 44 h, comme décrite ci-dessus, et la conversion complète de HMF en HMFA après 4 h de transamination à 25 °C a été confirmée de la même manière.

11 Procédé hybride « one-pot/one-step »

11.1 *En vial*

La réaction 1P1S a été réalisée dans un flacon de 2 ml. Ainsi, 4 mg de catalyseur solide et 1 mg de Bm-TA@EziGTM OPAL ont été ajoutés à 10 ml d'une solution de HMF de 10 mM dans un tampon aqueux de phosphate de sodium de 100 mM à pH 7.3 avec 10 mM de (S)-MBA et 1 mM de PLP. Le mélange réactionnel a été incubé à 50 °C dans un four et agité à l'aide d'un agitateur rotatif (Thermoscientific, USA) à 22 rpm. Des aliquotes (50 µL) ont été prélevées après 0, 16, 24 et 48 h et la formation de produits a été confirmée par HPLC-DAD.

Parallèlement à la synthèse, les blancs ont été effectués dans les mêmes conditions, mais en l'absence du catalyseur chimique, l'absence du biocatalyseur ou pas de catalyseurs.

11.2 Au *BioLectorPro*

Le criblage automatisé s'est mis au point via l'utilisation de l'appareil *BioLectorPro*[®]. 1 ml d'une solution mère contenant 10 mM du substrat désiré, 10 mM de (*S*)-MBA, 1 mM de PLP dans un tampon KH_2PO_4 100 mM pH 7.3 est introduite dans chacun des 48 puits d'une Flower Plate (FP). La quantité appropriée de catalyseur hétérogène d'oxydation (1, 2, 4 ou 8 mg) est rajoutée au milieu avec la quantité désirée de *Bm*-TA@EziGTMOPAL. La plaque est scellée à l'aide d'un film de silicone puis d'un film transparent pour limiter l'évaporation du milieu réactionnel. Des ouvertures sont pratiquées au-dessus des réacteurs pour aider au futur prélèvement. La plaque est introduite dans le *BioLectorPro*[®] et mise à agiter à 400 rpm sous 50 °C. 30 μ de prélèvements sont effectués toutes les 8 h et sont introduits dans une plaque à fond en V préalablement scellés avec un film. La plaque servant au prélèvement est conservée à 4 °C à l'aide d'une plaque 96 puits à fond en V pour limiter l'évaporation. Avant chaque prélèvement un temps de latence de 180 secondes est observé afin de permettre au catalyseur hétérogène de décanter dans le fond du puits et éviter tout problème de pipetages. Les plaques 96 puits à fond en v sont stockés et conservés à -20 °C avant d'être analysés par HPLC-DAD selon la procédure générale.

12 Désamination oxydative

La désamination oxydative du HMFA a été réalisée dans un flacon de GC de 2 ml. 2 mg de catalyseur solide ont été ajoutés à 1 ml d'une solution de substrat de 10 mM dans un tampon de phosphate de sodium de 100 mM (pH 7, 8 ou 9) dans de l'eau ultra-pure. Les flacons ont été incubés à 60 °C dans l'étuve et agités à l'aide d'un agitateur rotatif (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) à 22 rpm, avec un angle de 45° par rapport à l'axe de rotation pour maintenir une bonne homogénéité dans les mélanges réactionnels. Une réaction à blanc a été réalisée sans ajout de catalyseur. Pour suivre la formation du produit, des aliquotes de 50 μ l ont été recueillies après 24 et 48 heures pour l'analyse par HPLC-DAD. Les analyses des produits de la réaction ont été effectuées sur une HPLC-DAD-MS-LCMS-2020 ultrarapide (Shimadzu, Japon) selon la procédure générale.

13 Catalyseur monosupporté

13.1 Immobilisation enzymatique sur le catalyseur Pd@OPAL

La quantité désirée de catalyseur Pd@OPAL (2,4,8,12 ou 20 mg) est mise à incuber dans une solution (1 ml) de tampon phosphate de potassium pH 7.3 100 mM contenant 1 mM de PLP et 200 µg de *Bm*-TA préalablement purifié. Le milieu est mis à tourner à 25 rpm sur un agitateur rotatif (thermoscientific, USA) à 25 rpm à température ambiante pendant 60 min. Le milieu est ensuite centrifugé à 11 000 rpm et le surnageant est retiré. Une solution tamponnée de KH₂PO₄ (100 mM, pH 7.3) est rajoutée au milieu pour laver le catalyseur Pd@*Bm*-TA@EzigTMOPAL. Le cycle de lavage est répété trois fois. Une fois le dernier surnageant retiré le catalyseur hybride synthétisé est utilisé tel quel dans les milieux réactionnels.

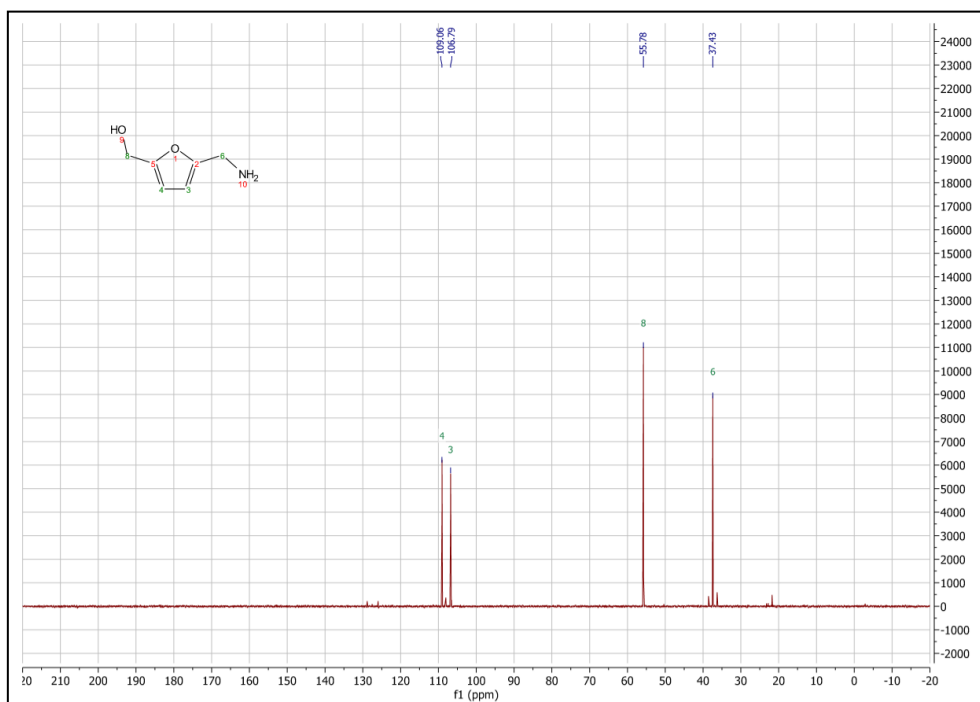
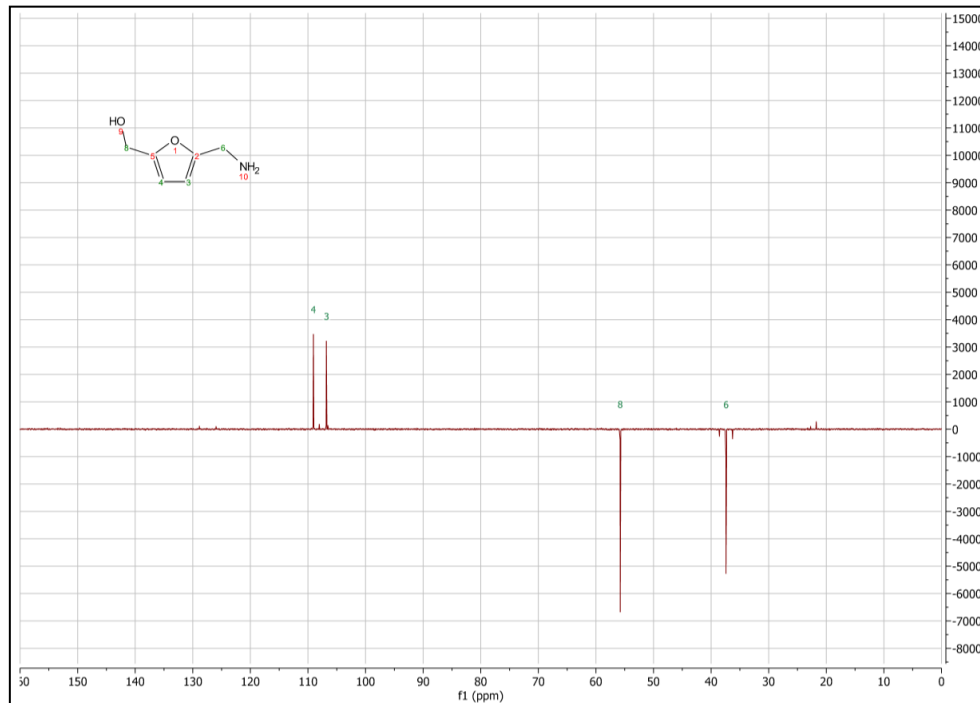
13.2 Réactions avec le catalyseur Pd@*Bm*-TA@EzigTMOPAL.

Une solution tamponnée KH₂PO₄ (pH 7.3 100 mM) contenant 10 mM de HMF, 10 mM de (*S*)-MBA et 1 mM de PLP dans un tampon phosphate de potassium (pH 7.3, 100 mM) est introduite dans le réacteur (vial GC de 2 ml) contenant la quantité désirée de catalyseur Pd@*Bm*-TA@EzigTMOPAL. Le milieu est mis à tourner à 25 rpm sur un agitateur rotatif (thermoscientific, USA) à 25 rpm à 50 °C pendant 48 h. 50 µl de prélèvement sont effectués à t4, t20, t24 et t48 h et analysé par HPLC-DAD à 210, 245 et 280 nm.

Annexes

Annexe A - Chapitre 1

Analyses RMN

Figure 75 : Spectre RMN ^{13}C (D_2O , 75 MHz, DEPT 45) du HMFA.Figure 76 : Spectre RMN ^{13}C (D_2O , 75 MHz, DEPT 135) du HMFA.

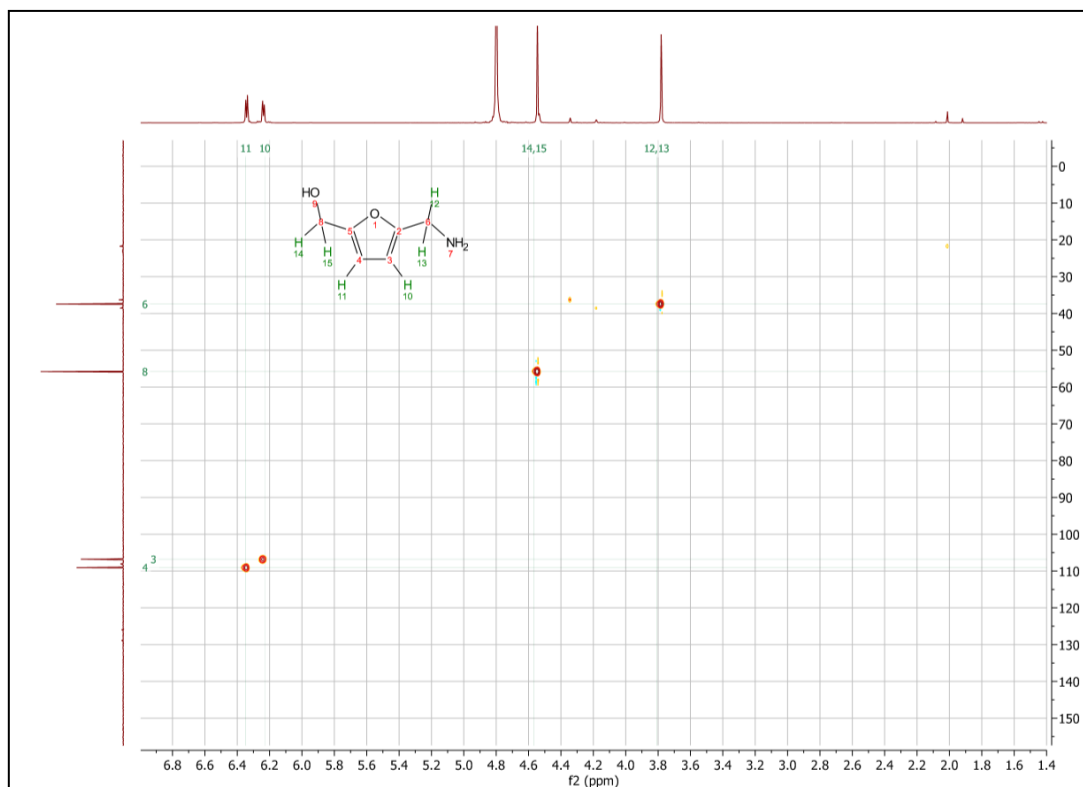


Figure 77 : Spectre RMN HSQC (D₂O, 75 MHz) du HMFA.

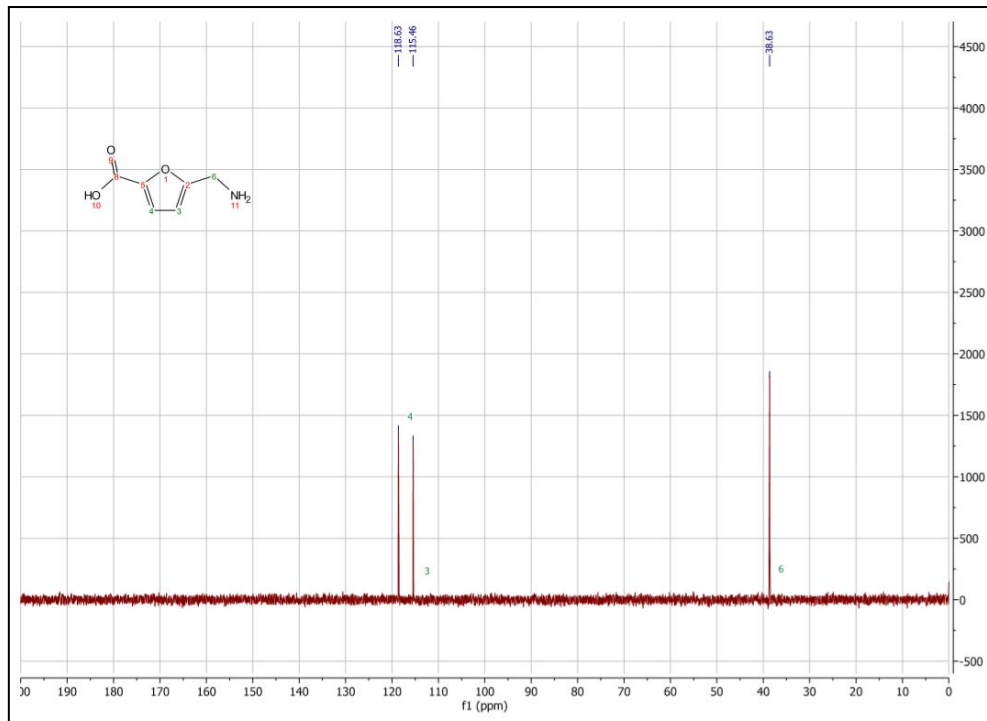


Figure 78 : Spectre RMN ¹³C (D₂O, 75 MHz, DEPT 45) de l'AMFC.

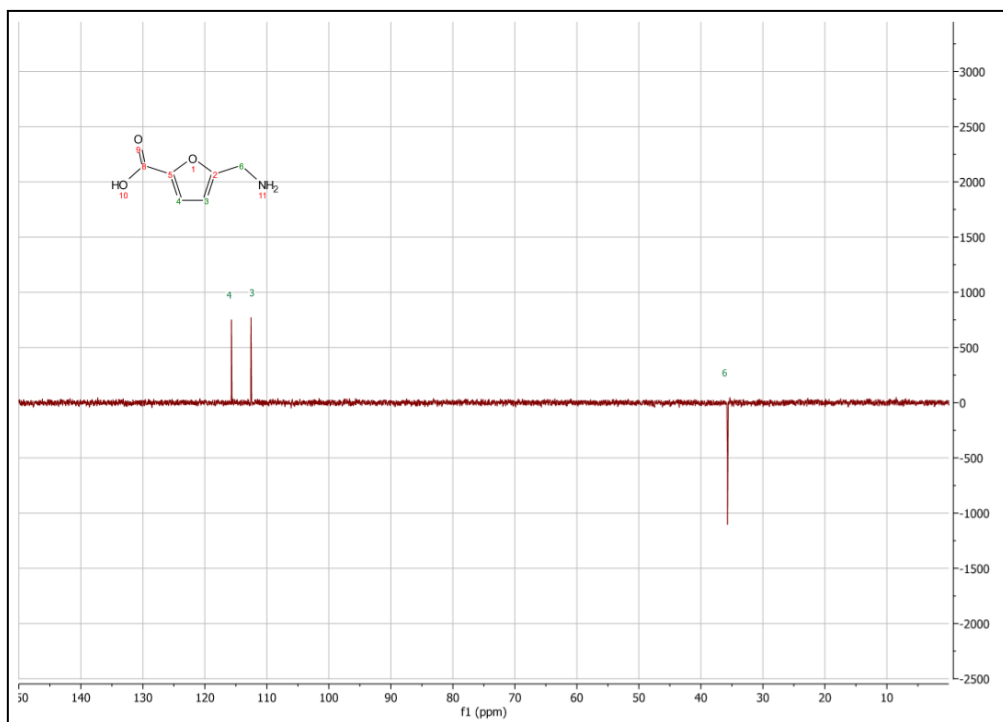


Figure 79 : Spectre RMN ^{13}C (D_2O , 75 MHz, DEPT 135) de l'AMFC.

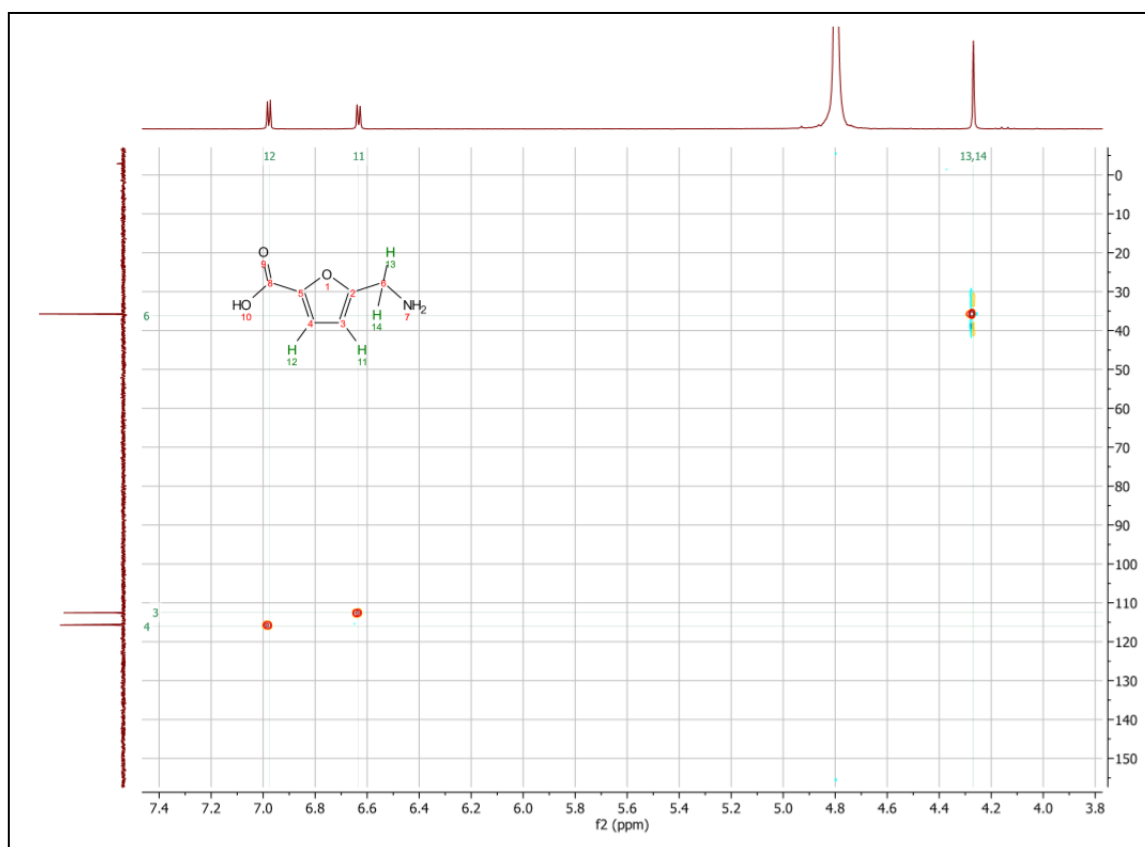


Figure 80 : Spectre RMN HSQC (D_2O , 75 MHz) du HMFA.

Courbes de calibration HPLC-DAD

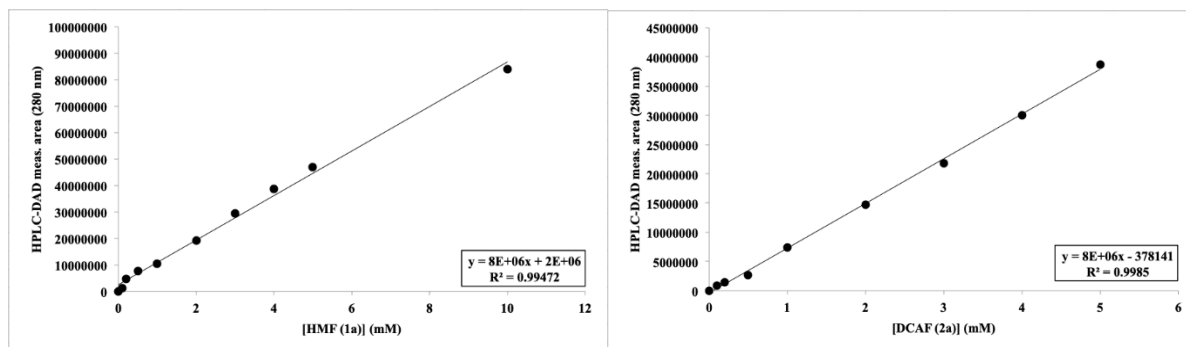


Figure 81 : Courbe de calibration HPLC-DAD du HMF. **Figure 82 :** Courbe de calibration HPLC-DAD du DCAF.

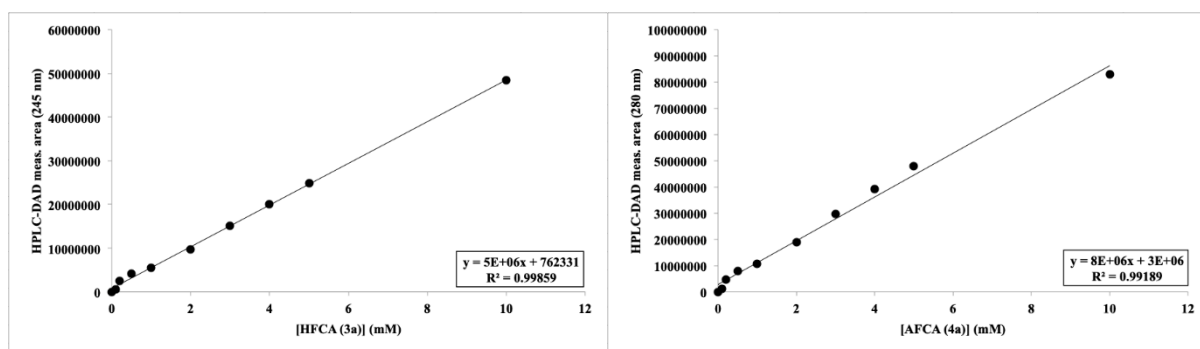


Figure 83 : Courbe de calibration HPLC-DAD du HFCA **Figure 84 :** Courbe de calibration HPLC-DAD de l'AFCA

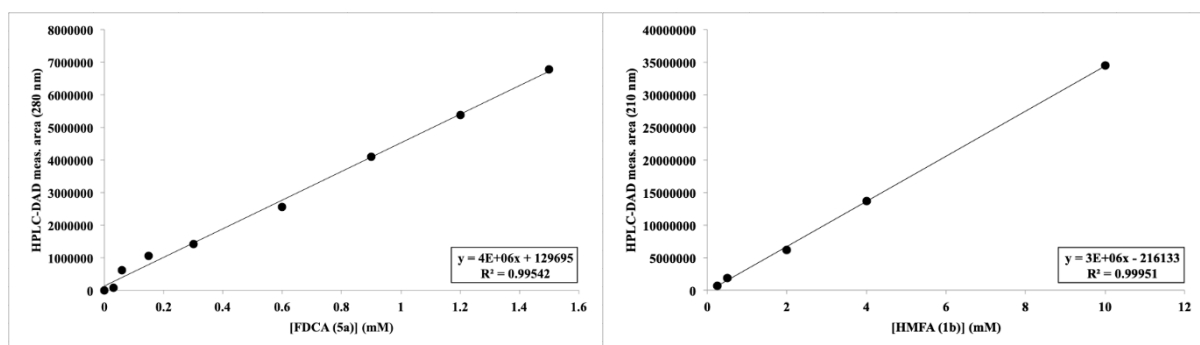


Figure 85 : Courbe de calibration HPLC-DAD du FDCA. **Figure 86 :** Courbe de calibration HPLC-DAD du HMFA.

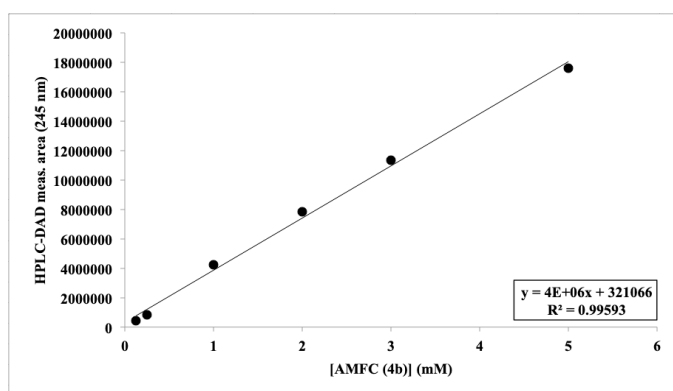


Figure 87 : courbe de calibration HPLC-DAD de l'AMFC.

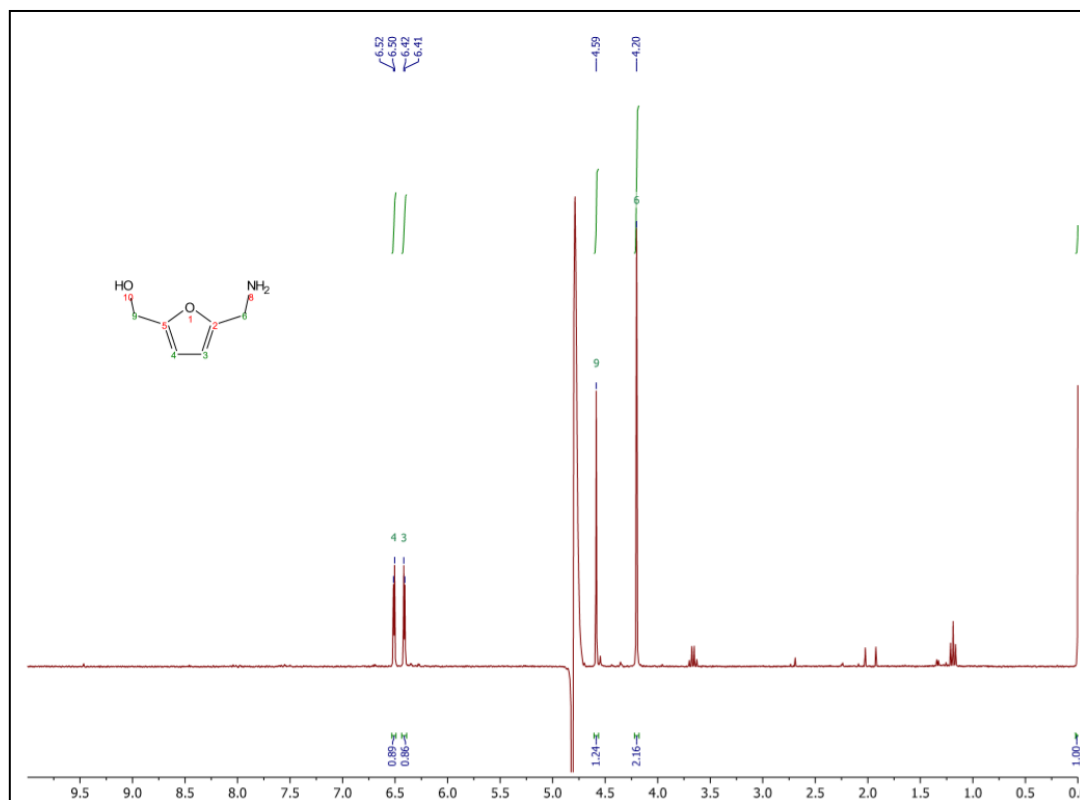


Figure 88 : Spectre RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) du blanc (sans catalyseur) de la désamination oxydative à t48 h à 60 °C du 5-Hydroxyméthyl-2-aminométhylfuran (HMFA).

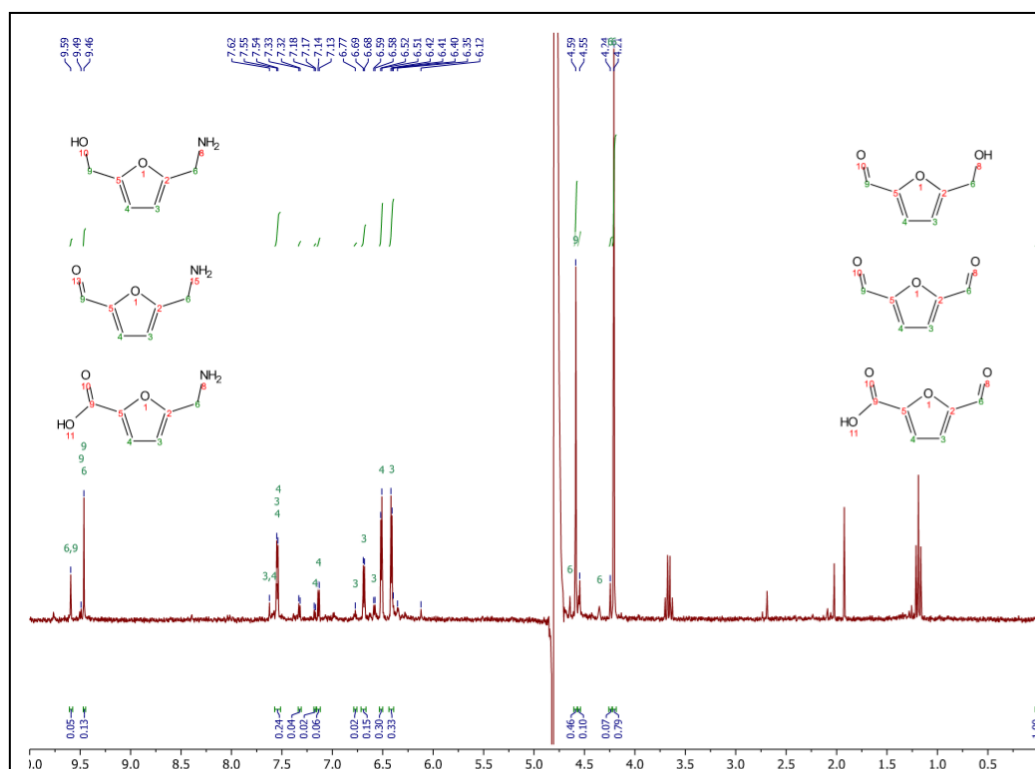


Figure 89 : Spectre RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) de désamination oxydative à t48 h à 60 °C du 5-Hydroxyméthyl-2-aminométhylfuran (HMFA).

Annexe B – Chapitre 2

Analyses RMN

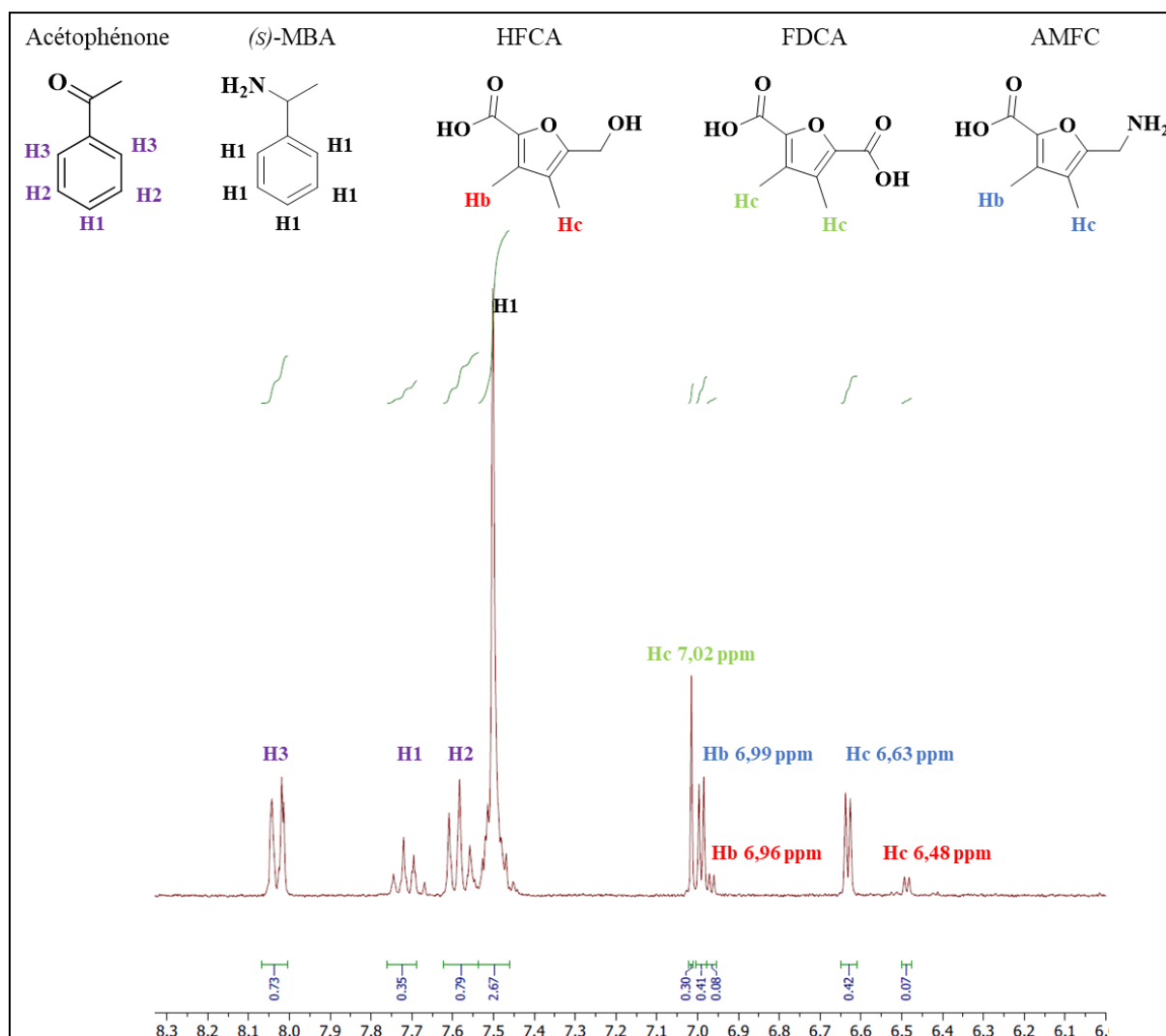


Figure 90 : RMN¹H entre 6 et 8,5 ppm du milieu réactionnel brut de la mise en oeuvre d'un procédé hybride 1P2S combinant un catalyseur Pt@SiO₂ et la Cv-TA@EziGTMOPAL

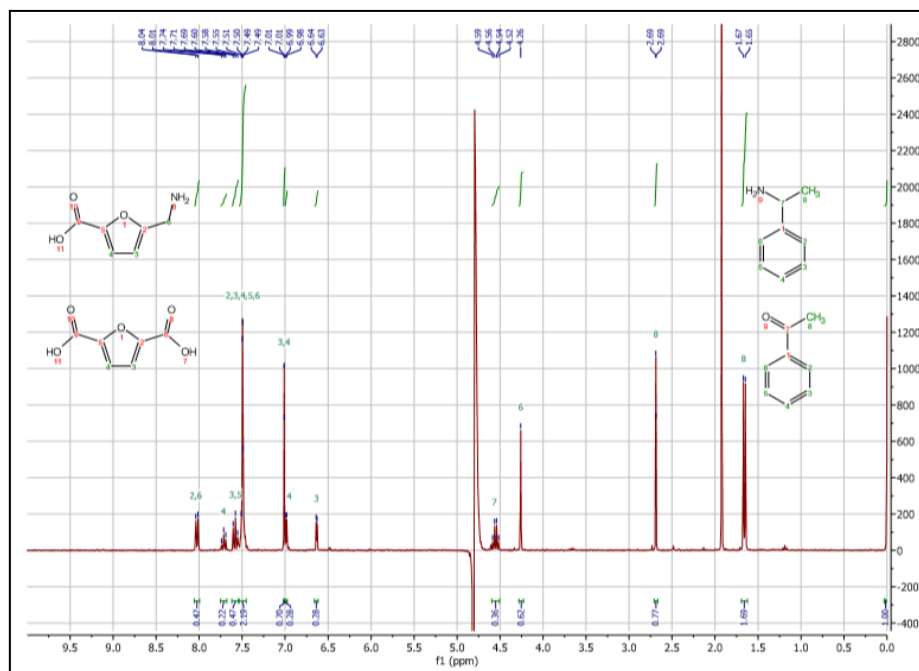


Figure 91 : Spectre RMN ¹H du premier processus catalytique hybride à un pot/deux étapes pour la conversion de HMF en AMFC après 68 h de réaction.

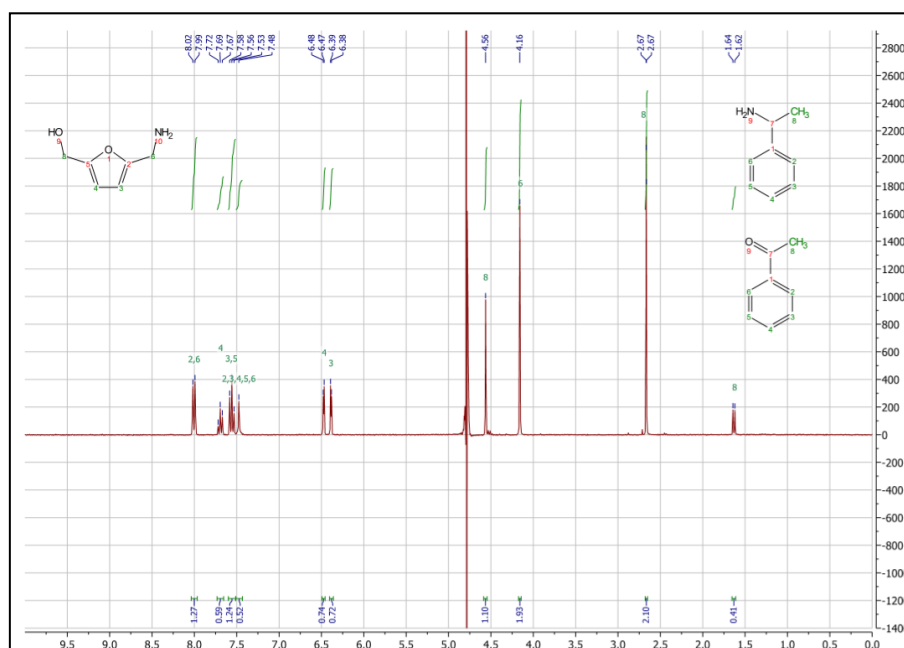


Figure 92 : Spectre RMN ¹H du blanc (aucun catalyseur chimique ajouté) correspondant au premier processus catalytique hybride à un pot/deux étapes, après 74 h de réaction avec de la (S)-MBA comme donneur d'amine, avec le HMFA comme produit unique de la réaction.

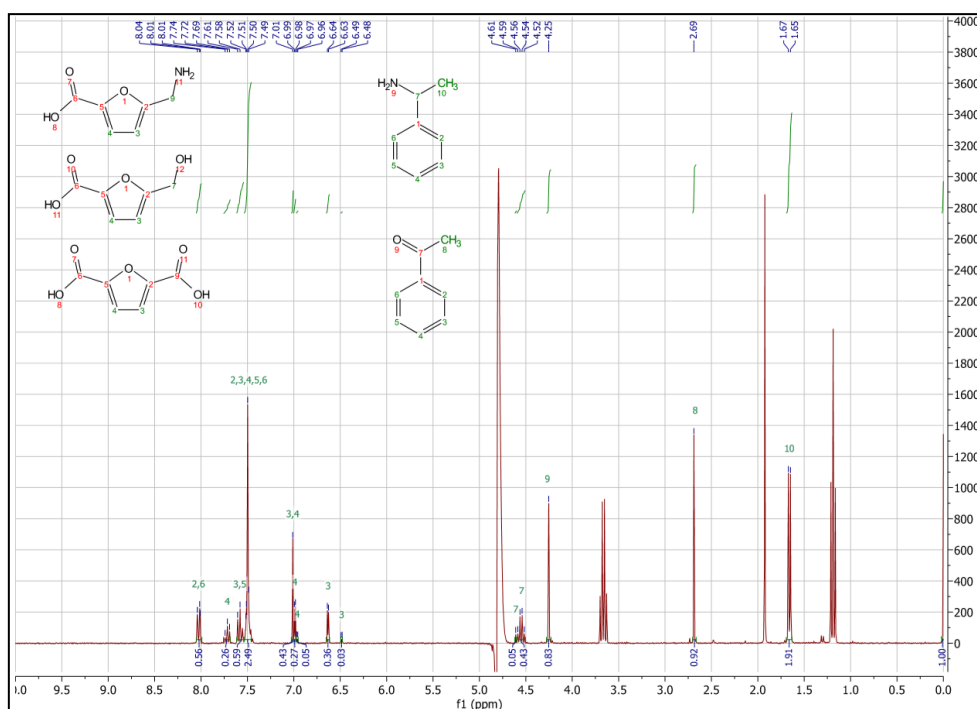


Figure 93 : Spectre RMN ¹H du 2^{ème} procédé catalytique hybride à un pot/deux étapes pour la conversion de HMF en AMFC après 52 h de réaction avec de la MBA comme donneur d'amine.

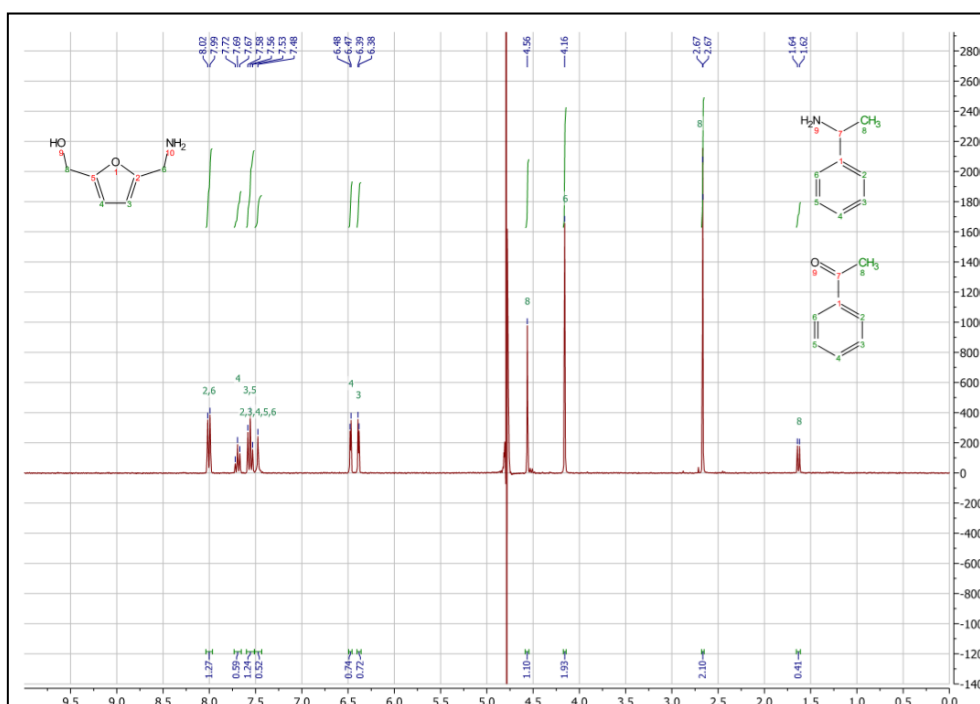


Figure 94 : Spectre RMN ¹H du blanc (aucun catalyseur chimique ajouté) correspondant au 2^{ème} processus catalytique hybride à un pot/deux étapes, après 52 h de réaction avec de la MBA comme donneur d'amine, avec le HMFA comme produit unique de la réaction.

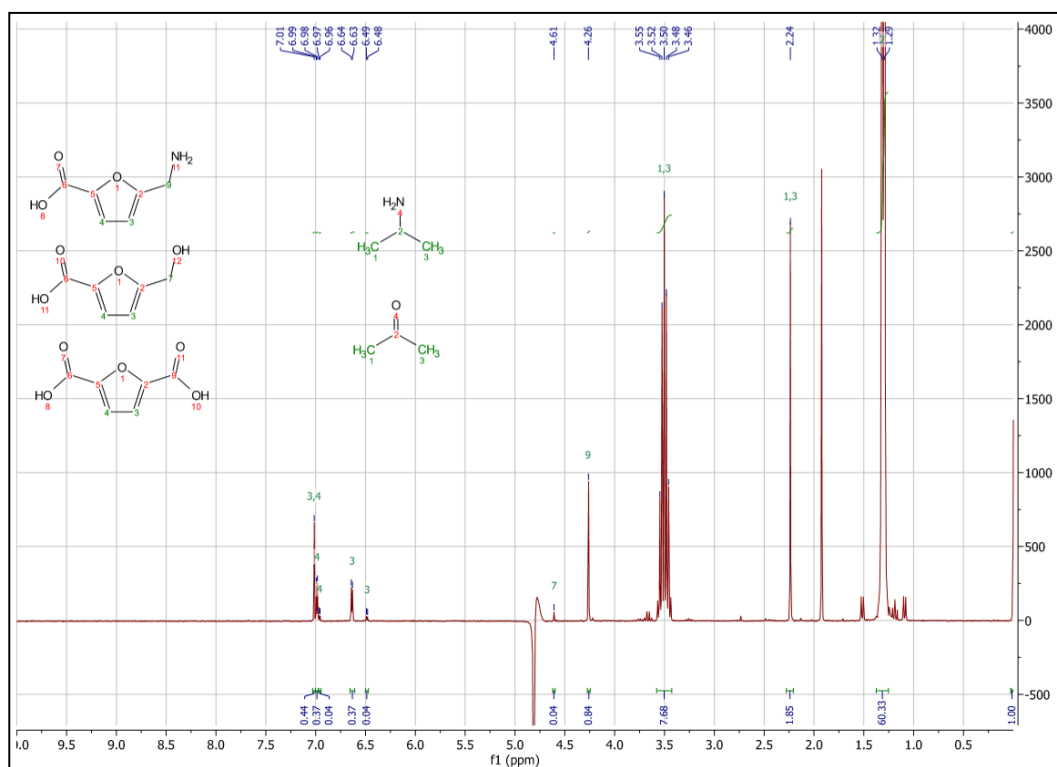


Figure 95 : Spectre RMN ^1H du 3^{ème} procédé catalytique hybride à un pot/deux étapes pour la conversion de HMF en AMFC après 52 h de réaction avec l'IPA comme donneur d'amine.

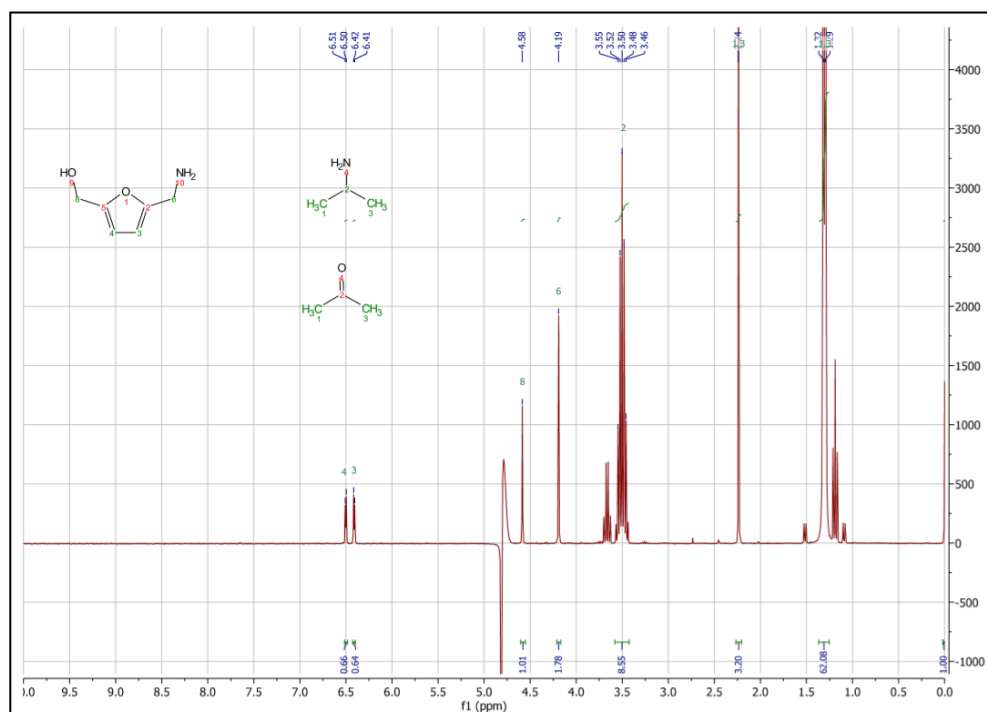


Figure 96 : Spectre RMN ^1H du blanc (aucun catalyseur chimique ajouté) correspondant au troisième processus catalytique hybride à un pot/deux étapes, après 52 h de réaction avec de l'IPA comme donneur d'amine, avec le HMFA comme produit unique de la réaction.

Annexe C – Chapitre 3

Immobilisation de la B9AZ94

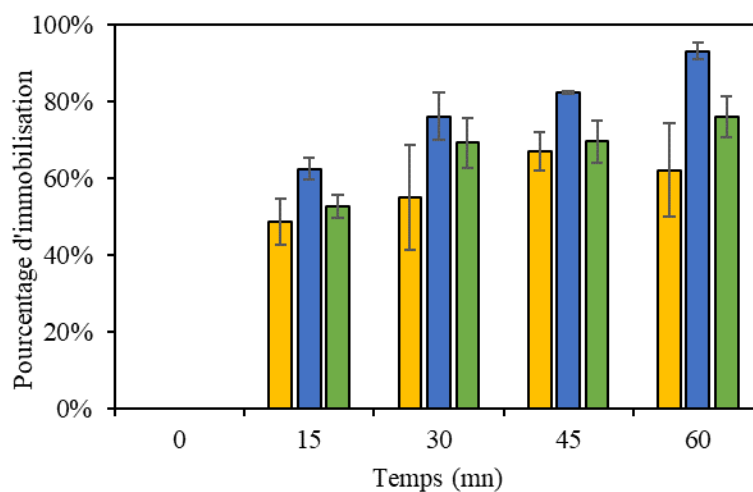


Figure 97 : Pourcentage d'immobilisation de la B9AZ94 (1 mg, *Bm*-TA) sur 5 mg de support Ezig™. (OPAL ■, CORAL ■ et AMBER ■) Les concentrations sont mesurées par l'intermédiaire d'un dosage au réactif de Bradford.

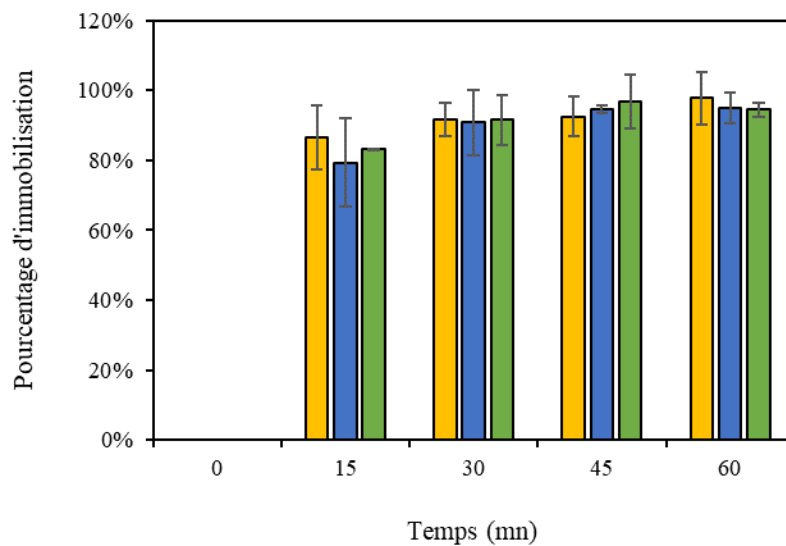


Figure 98 : Pourcentage d'immobilisation de la B9AZ94 (1 mg, *Bm*-TA) sur 10 mg de support Ezig™. (OPAL ■, CORAL ■ et AMBER ■) Les concentrations sont mesurées par l'intermédiaire d'un dosage au réactif de Bradford.

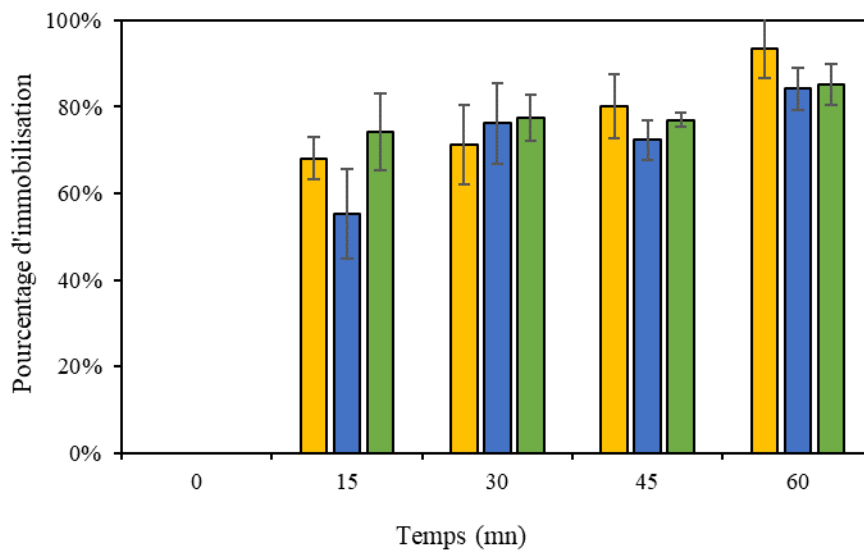


Figure 99 : Pourcentage d'immobilisation de la B9AZ94 (1 mg, *Bm*-TA) sur 15 mg de support Ezig™.(OPAL ■, CORAL ■ et AMBER ■) Les concentrations sont mesurées par l'intermédiaire d'un dosage au réactif de Bradford.

Caractérisations des catalyseurs
Analyses XRD

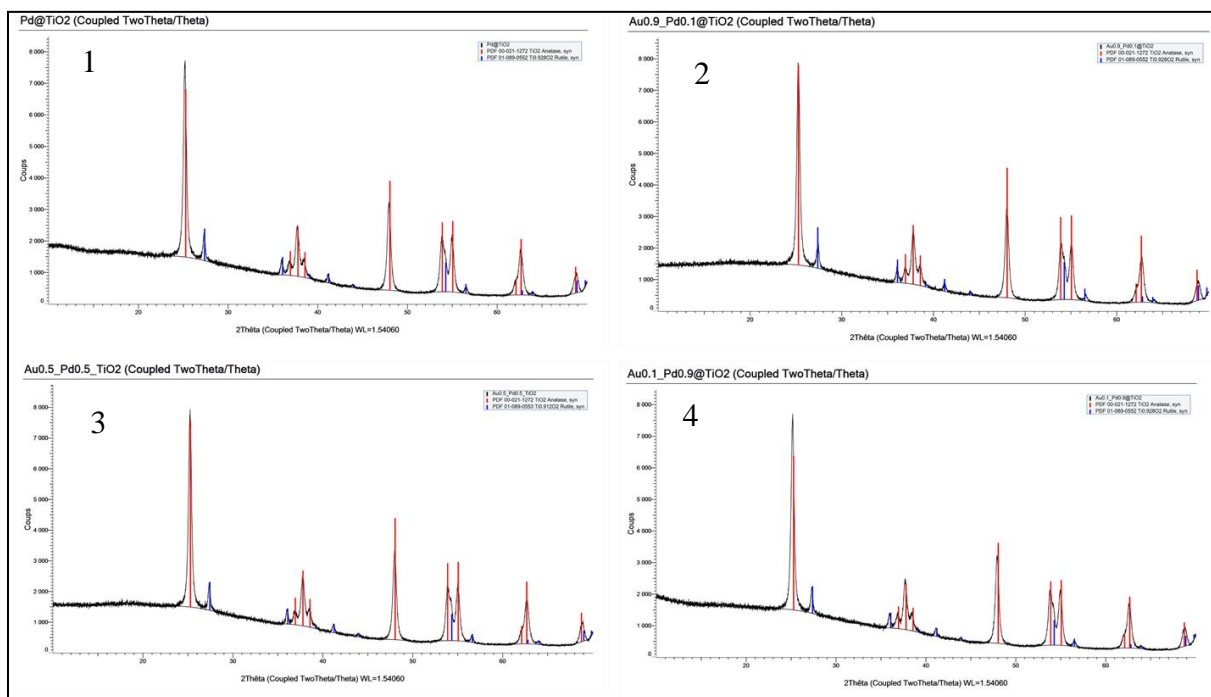


Figure 100 : Spectre XRD des catalyseurs 1) Pd@TiO₂ 2) 0.9Au-0.1Pd@TiO₂ 3) 0.5Au-0.5Pd@TiO₂ 4) 0.1Au-0.9Pd@TiO₂.

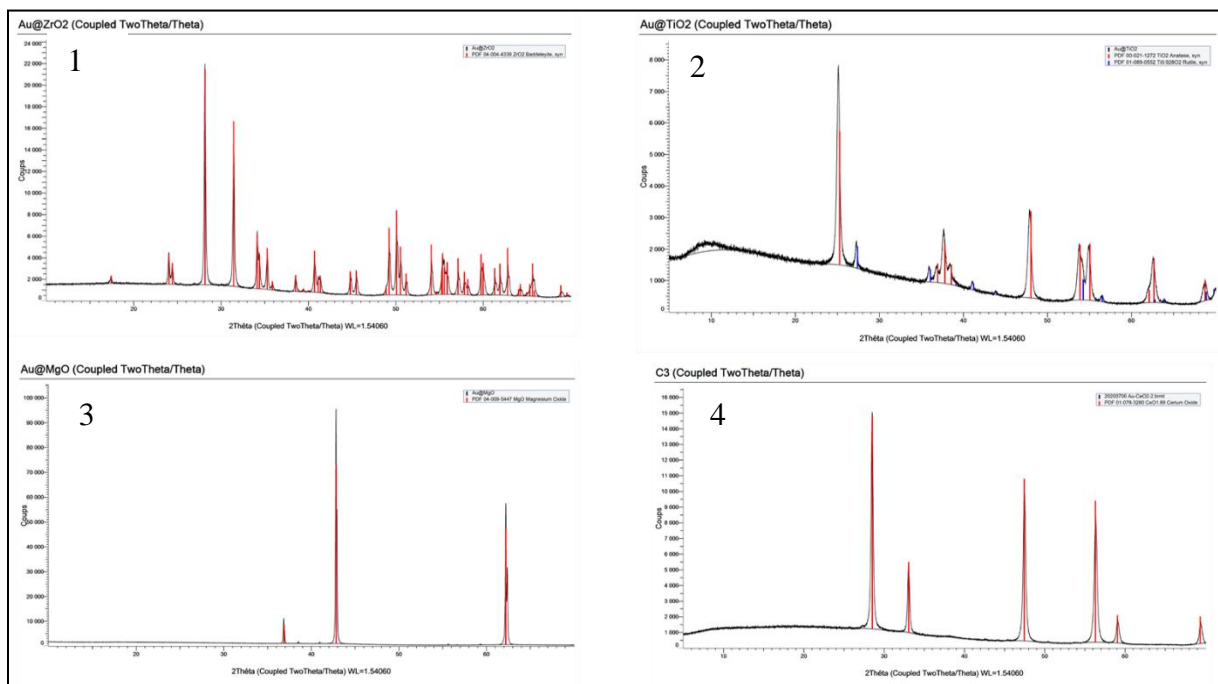


Figure 101: Spectre XRD des catalyseurs 1) Au@ZrO₂ 2) Au@TiO₂ 3) Au@MgO 4) Au@CaO.

Analyses XPS

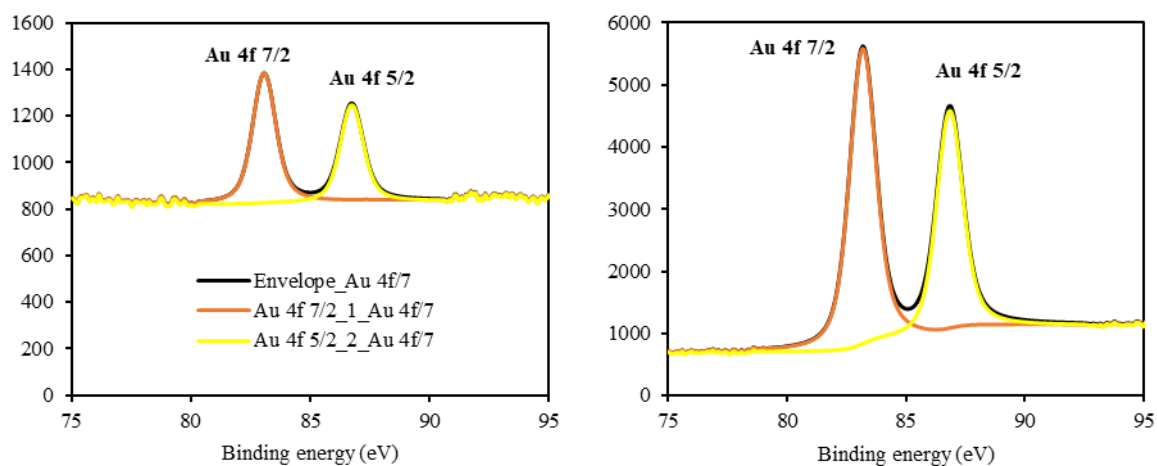


Figure 102 : Analyse XPS du catalyseur Au@SiO₂ et Au@CaO (■■ envelope Au 4f/7, ■■ Au 4f/7/2_Au4f/7, ■■ Au 4f/5/2_Au4f/7).

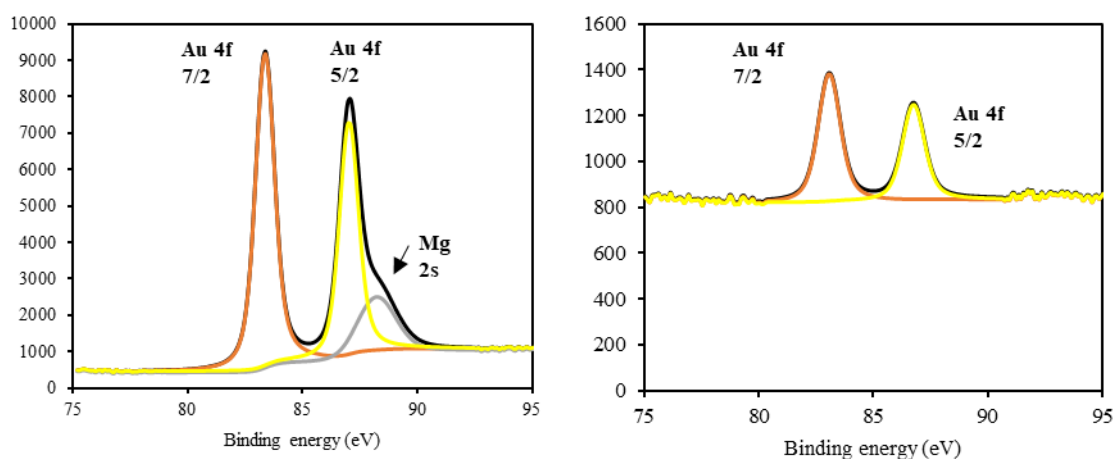


Figure 103 : Analyse XPS du catalyseur Au@MgO et Au@SiO₂ (■■ envelope Au 4f/7, ■■ Au 4f/7/2_Au4f/7, ■■ Au 4f/5/2_Au4f/7 ■■ Mg 2 s).

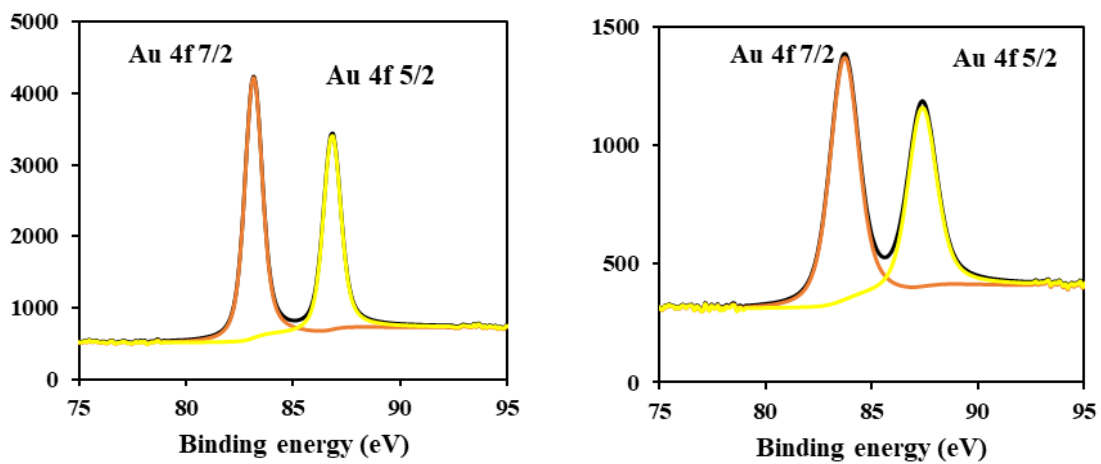


Figure 104 : Analyse XPS du catalyseur Au@CeO₂ et Au@TiO₂ (— Enveloppe Au 4 f/8 — Au 4 f 7/2 — Au 4 f 5/2).

Analyses ICP

Tableau 25 : Pourcentage de métal dans les catalyseurs analysés par ICP.

Code du catalyseur	Support	Au %	Pd %	Pt %
C1	Al ₂ O ₃	1,13 %	-	-
C3	CaO	1,60 %	-	-
C4	CaO	2,29 %	-	-
C5	CeO ₂	6,87 %	-	-
C8	TiO ₂	-	0,37 %	-
C12	TiO ₂	0,28 %	0,47 %	-
C13	TiO ₂	1,04 %	0,09 %	0,48 %
C14	Al ₂ O ₃	-	0,90 %	0,93 %
C15	TiO ₂	-	0,96 %	0,86 %
C16	OPAL	5,60%	-	-
C22	CeO ₂	1,92%	-	0,20%
C23	SiO ₂	0,61 %	-	-
C29	OPAL	-	1,41%	-
C30	OPAL	-	-	0,83%
C31	TiO ₂	1,80 %	-	-
C32	MgO	0,49 %	-	-
C33	ZrO ₂	0,09 %	-	-
C34	MgO	-	1,57 %	-
C35	TiO ₂	-	0,95 %	-
C36	TiO ₂	0,16 %	0,50 %	-
C37	TiO ₂	0,32 %	0,17 %	-
C38	TiO ₂	0,43 %	0,13 %	-

*Analyses BET***Tableau 26** : Résultats BET obtenu sur l'analyse des catalyseurs sélectionnés.

Catalyst	Code du catalyseur	Surface area (m ² .g ⁻¹)	Pore volume (cm ³ .g ⁻¹)	Pore Size (Å)
Au@OPAL	C16	44	0,062	54
Au@CeO₂	C22	10	0,027	99
Au@SiO₂	C23	250	1.111	172
Au MOFs	C24	726	0,432	24
Au TiO₂	C31	44	0,133	113
Au@ZrO₂	C33	6	0,010	68
Au_{0.1}Pd_{0.9}@TiO₂	C36	39	0,116	111
Au_{0.5}Pd_{0.5}@TiO₂	C37	42	0,094	84
Au_{0.9}Pd_{0.1}@TiO₂	C38	48	0,131	102

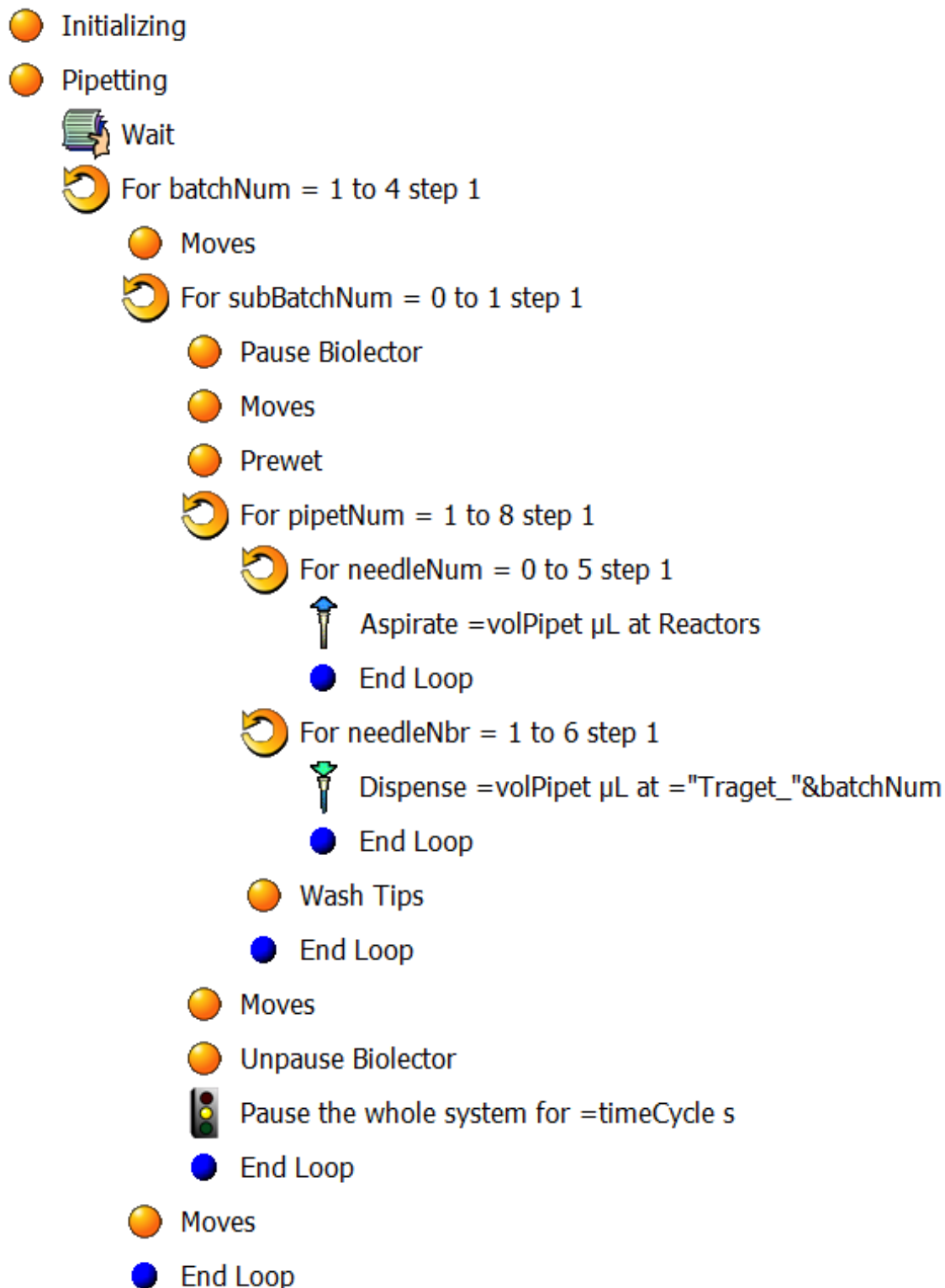
Programme robot du BLP

Figure 105 : Capture d'écran du programme robot effectué au BLP pour le criblage de catalyseur hétérogène d'oxydation et la mise en œuvre de procédés hybrides 1P1S.

Annexe D – Chapitre 6

Valorisation du 1,6-Hexanediol

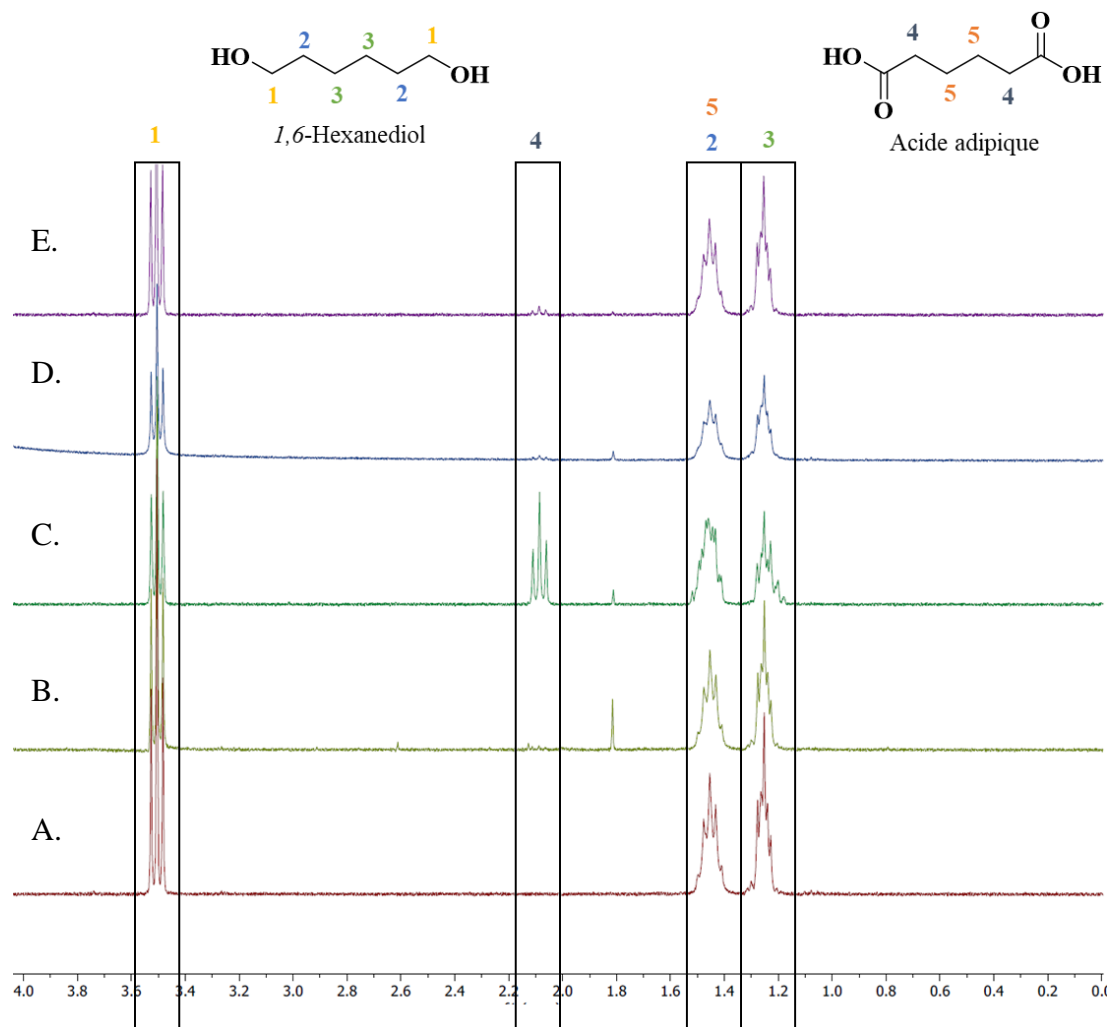


Figure 106 : RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) à t 48 h de l'oxydation 1,6-hexanediol dans un tampon KH_2PO_4 pH 7.3 100 mM à 50°C . 4 mg de catalyseur chimique sont introduits dans un vial de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à l'étuve. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Au@UiO-66- NH_2 (C24) **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO $_2$ (C31) **E.** Au@CeO $_2$ (C22).

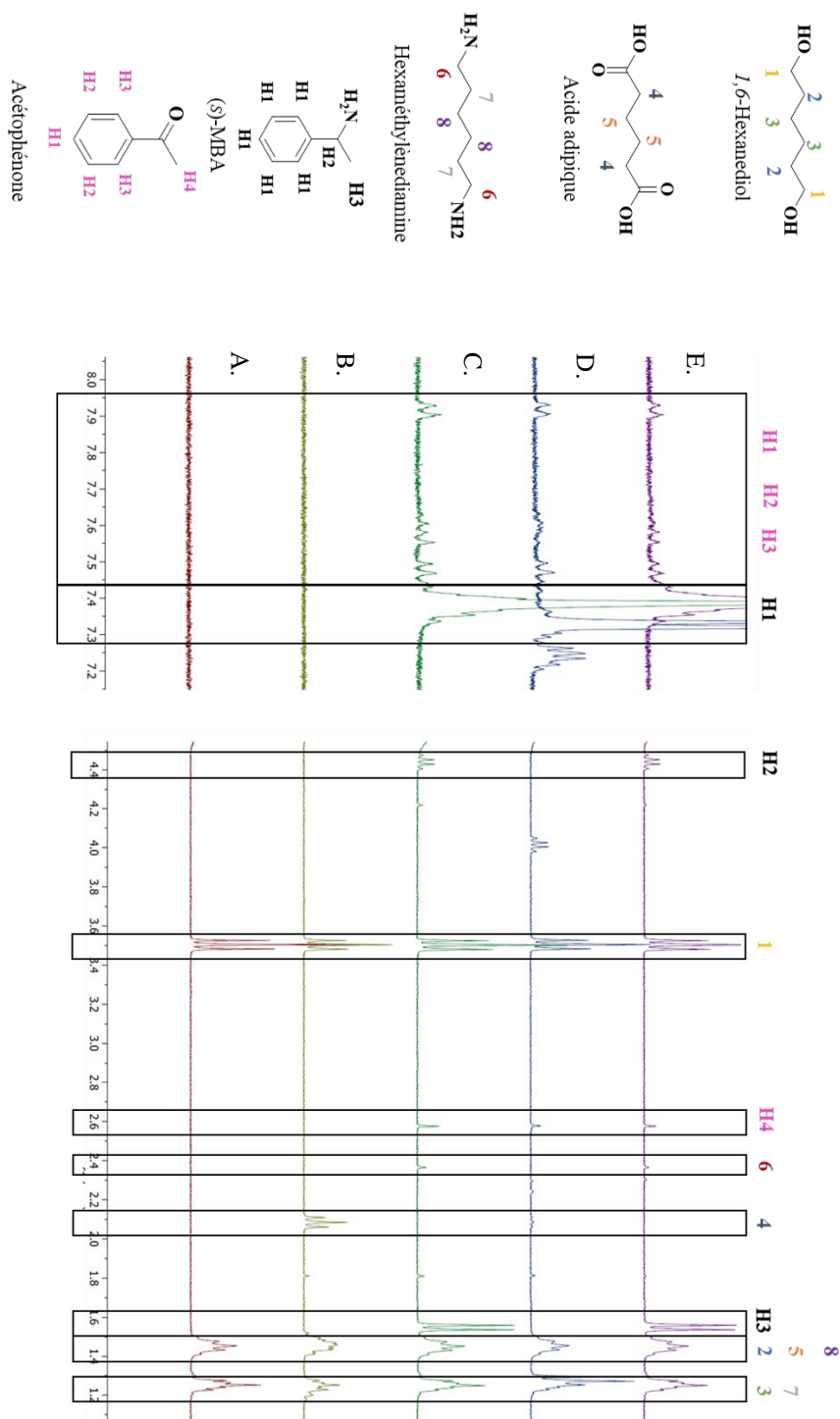


Figure 107 : RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH₂PO₄ pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM de 1,6-hexandiol avec 10 mM de (S)-MBA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 µg de Bm-TA immobilisé sur 1 mg de EziG™OPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Blanc sans enzyme **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO₂ (C31) **E.** Au@CeO₂ (C22).

Valorisation du 1,5-pentanediol

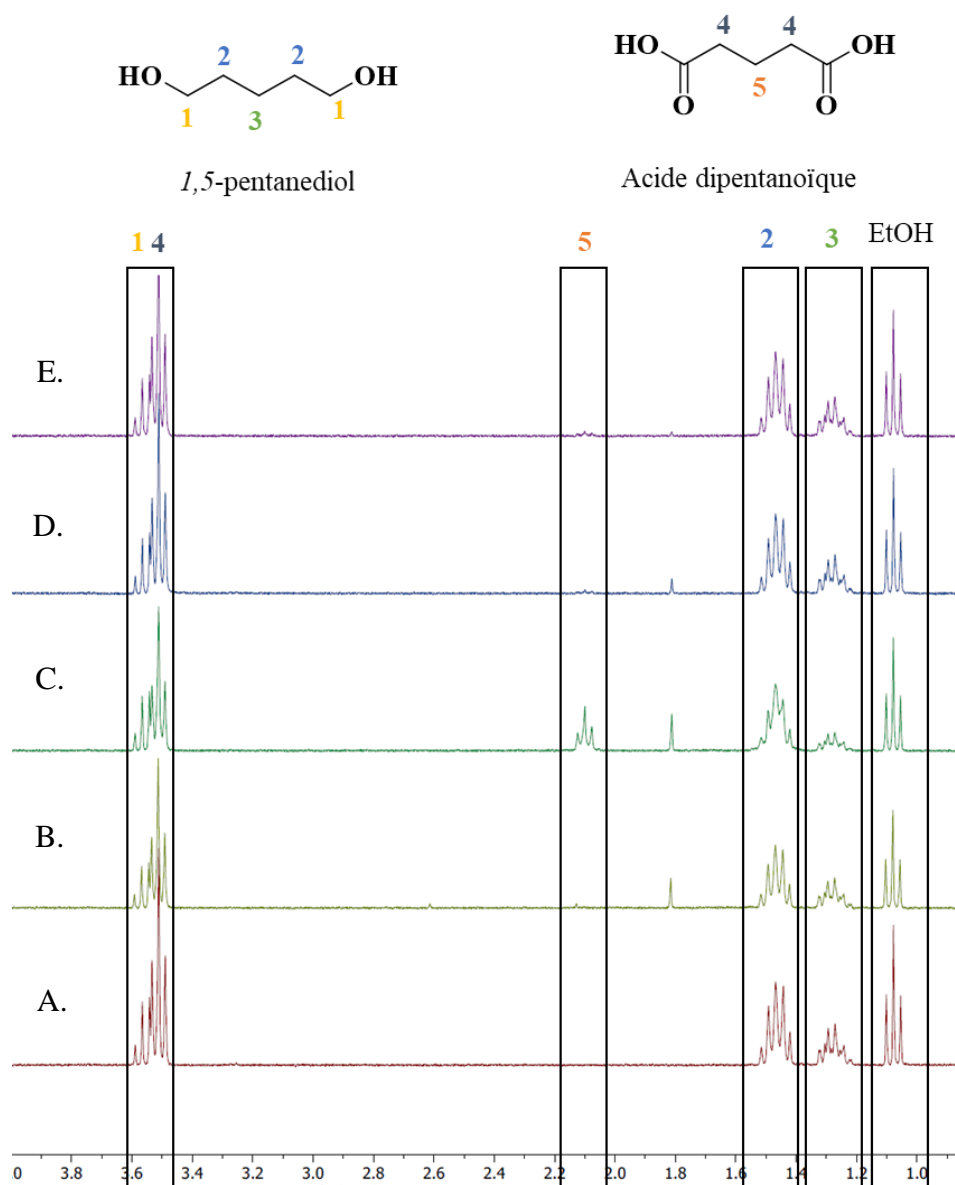


Figure 108 : RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) à t 48 h de l'oxydation 1,5-pentanediol dans un tampon KH₂PO₄ pH 7.3 100 mM à 50°C. 4 mg de catalyseur chimique sont introduits dans un vial de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à l'étuve. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Au@UiO-66-NH₂ (C24) **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO₂ (C31) **E.** Au@CeO₂ (C22).

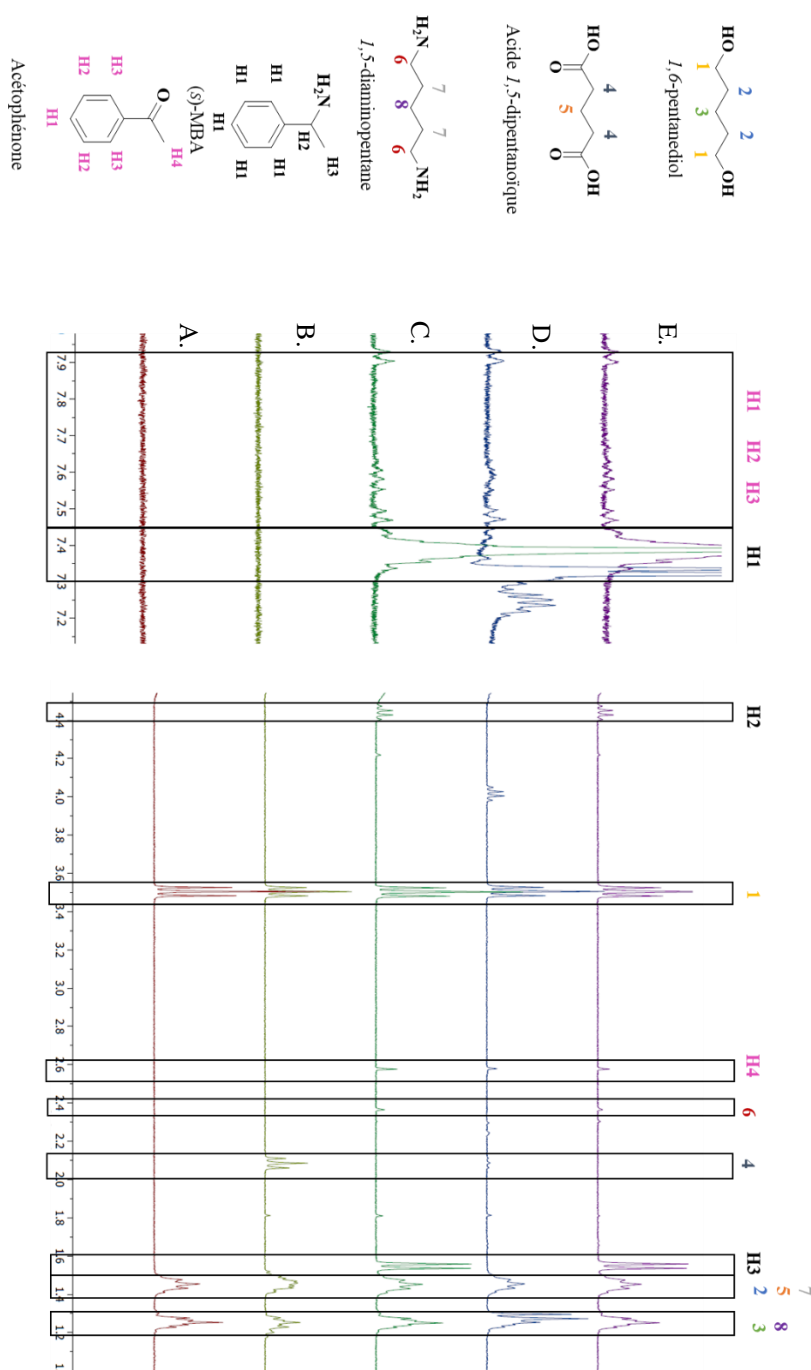


Figure 109 : RMN ^1H (D $_2$ O, 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH $_2$ PO $_4$ pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM de 1,5_pentanediol avec 10 mM de (S)-MBA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 μg de *Bm*-TA immobilisé sur 1 mg de EziGTMOPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Blanc sans enzyme **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO $_2$ (C31) **E.** Au@CeO $_2$ (C22).

Valorisation du furfuryl alcohol

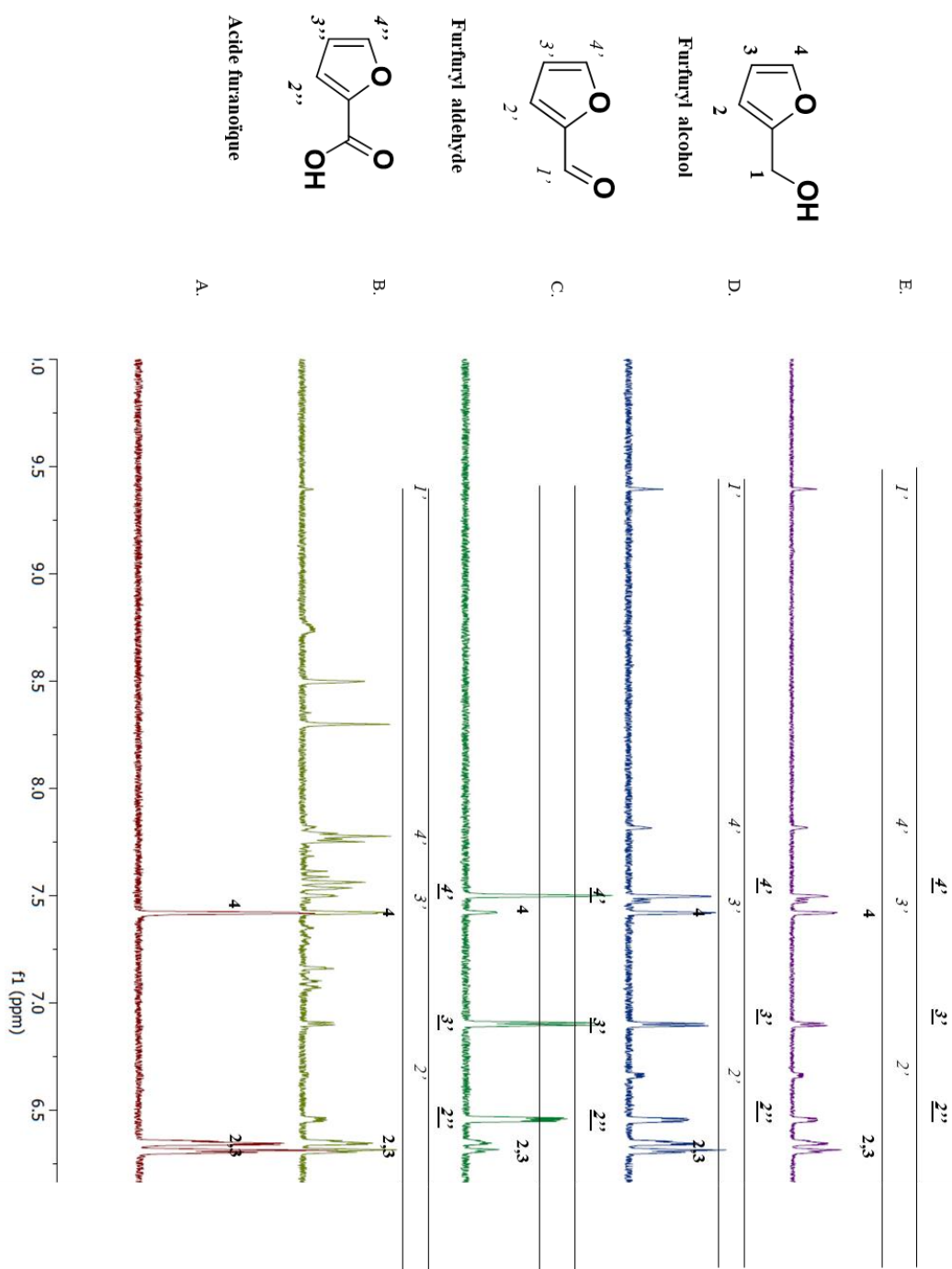


Figure 110 : RMN ^1H (D $_2$ O, 300 MHz) à t 48 h de l'oxydation du furfuryl alcohol dans un tampon KH $_2$ PO $_4$ pH 7.3 100 mM à 50°C. 4 mg de catalyseur chimique sont introduits dans un vial de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à l'étuve. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Au@UiO-66-NH $_2$ (C24) **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO $_2$ (C31) **E.** Au@CeO $_2$ (C22).

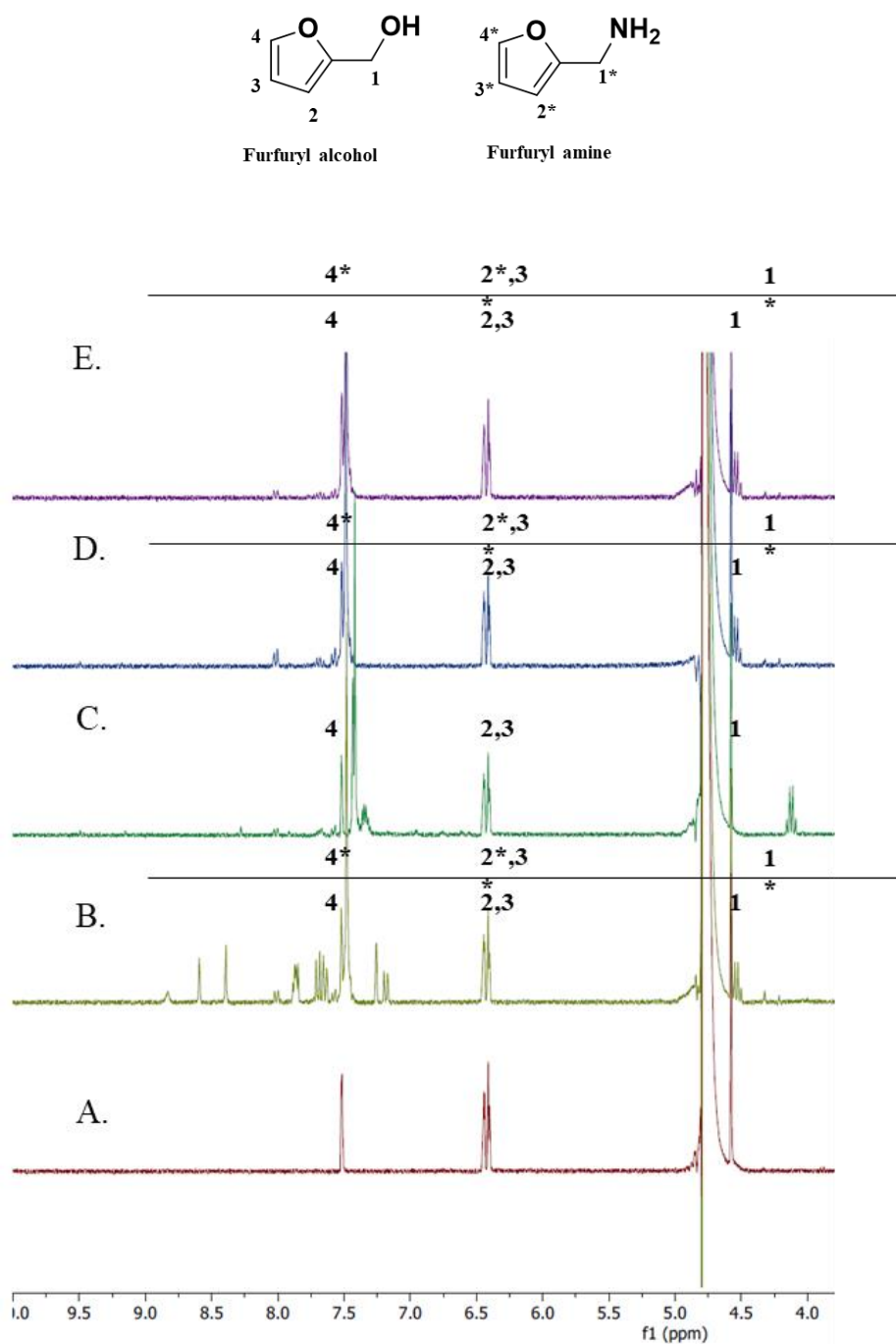


Figure 111 : RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH_2PO_4 pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM de furfuryl alcool avec 10 mM de (*S*)-MBA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 μg de *Bm*-TA immobilisé sur 1 mg de EziGTMOPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C . **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Au@UiO-66_NH₂ (C24) **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO₂ (C31) **E.** Au@CeO₂ (C22).

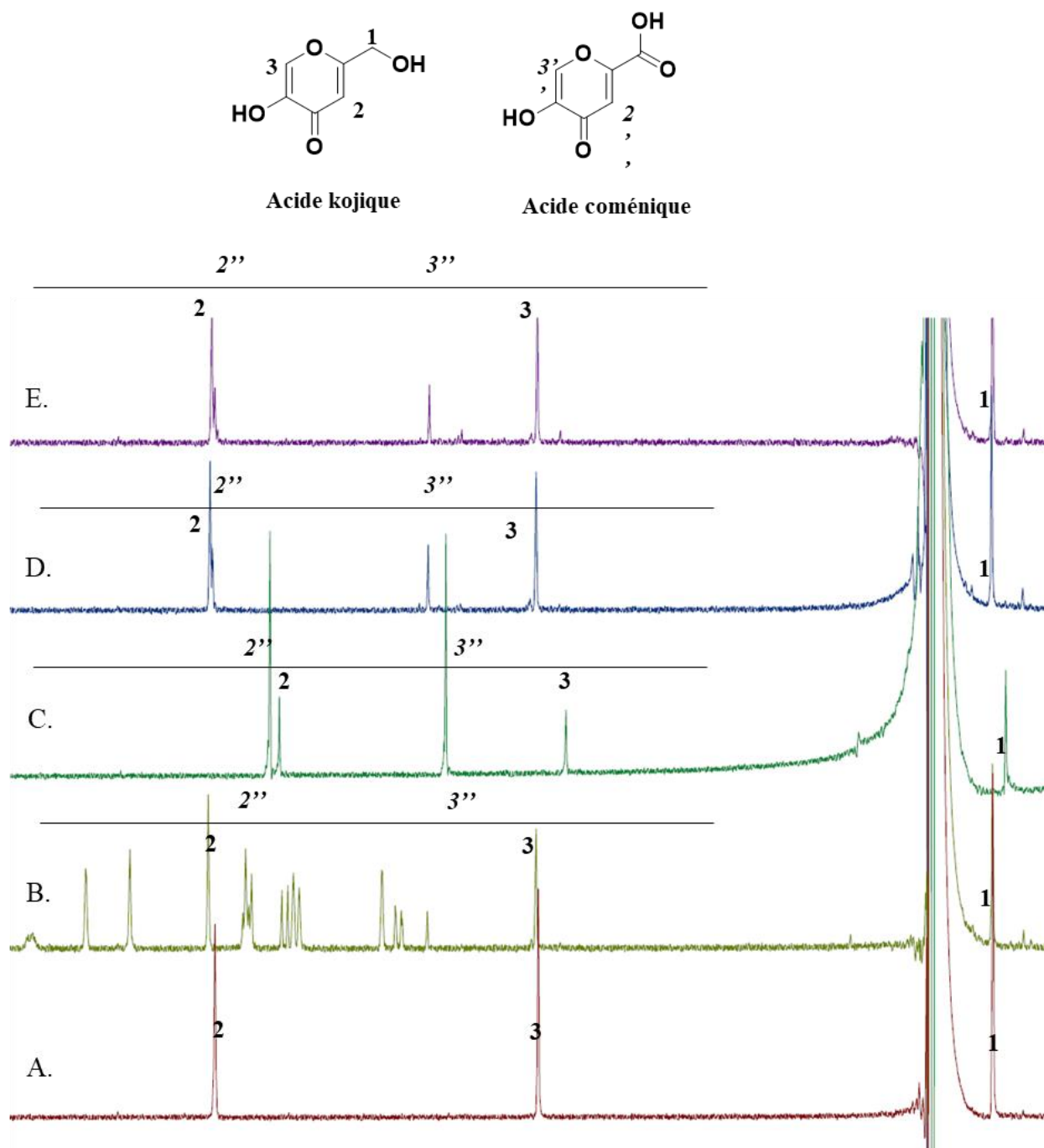
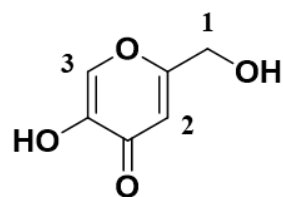
Valorisation de l'acide kojique

Figure 112 : RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) à t 48 h de l'oxydation de l'acide kojique dans un tampon KH₂PO₄ pH 7.3 100 mM à 50°C. 4 mg de catalyseur chimique sont introduits dans un vial de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à l'étuve. **A**. Blanc de réaction (sans catalyseur) **B**. Au@UiO-66-NH₂ (C24) **C**. Au@CaO (C4) **D**. Au@TiO₂ (C31) **E**. Au@CeO₂ (C22).



Acide kojique

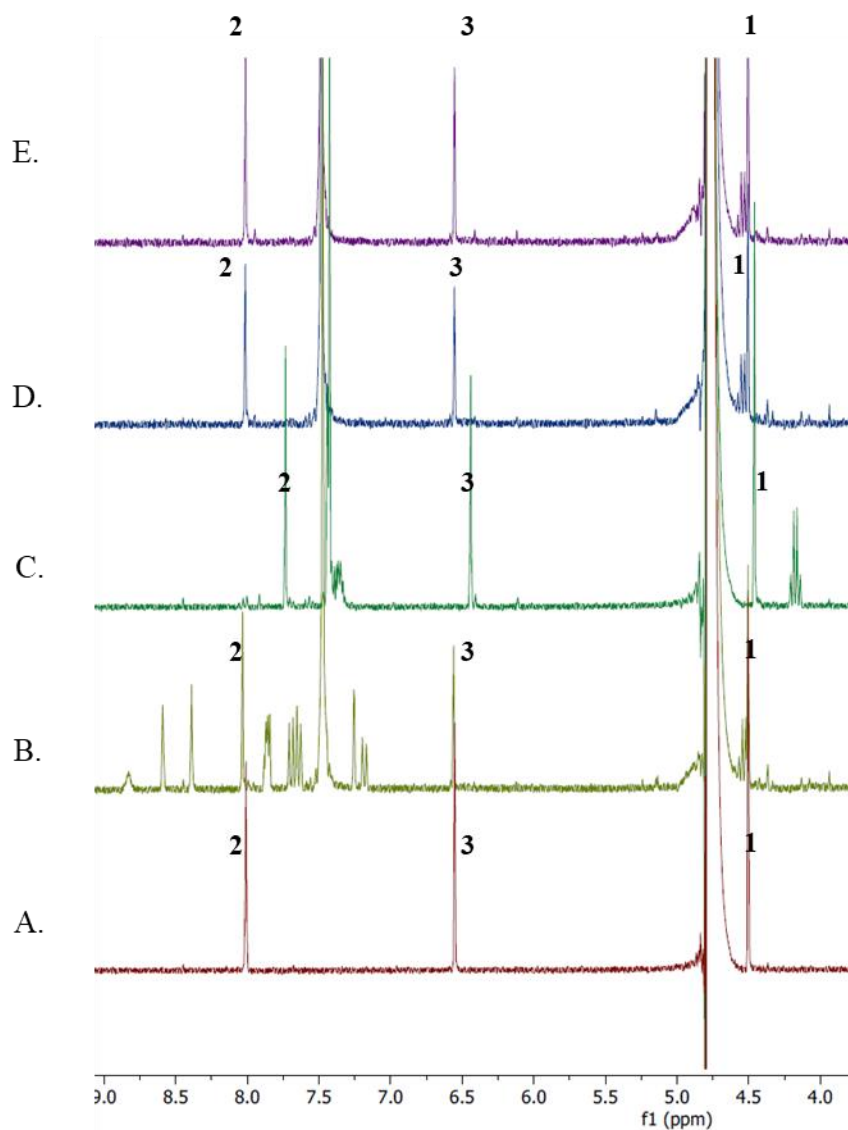


Figure 113 : RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH_2PO_4 pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM d'acide kojique avec 10 mM de (*S*)-MBA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 μg de *Bm*-TA immobilisé sur 1 mg de EziGTMOPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C . **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Au@UiO-66- NH_2 (C24) **C.** Au@CaO (C4) **D.** Au@TiO $_2$ (C31) **E.** Au@CeO $_2$ (C22).

Valorisation du myrténol

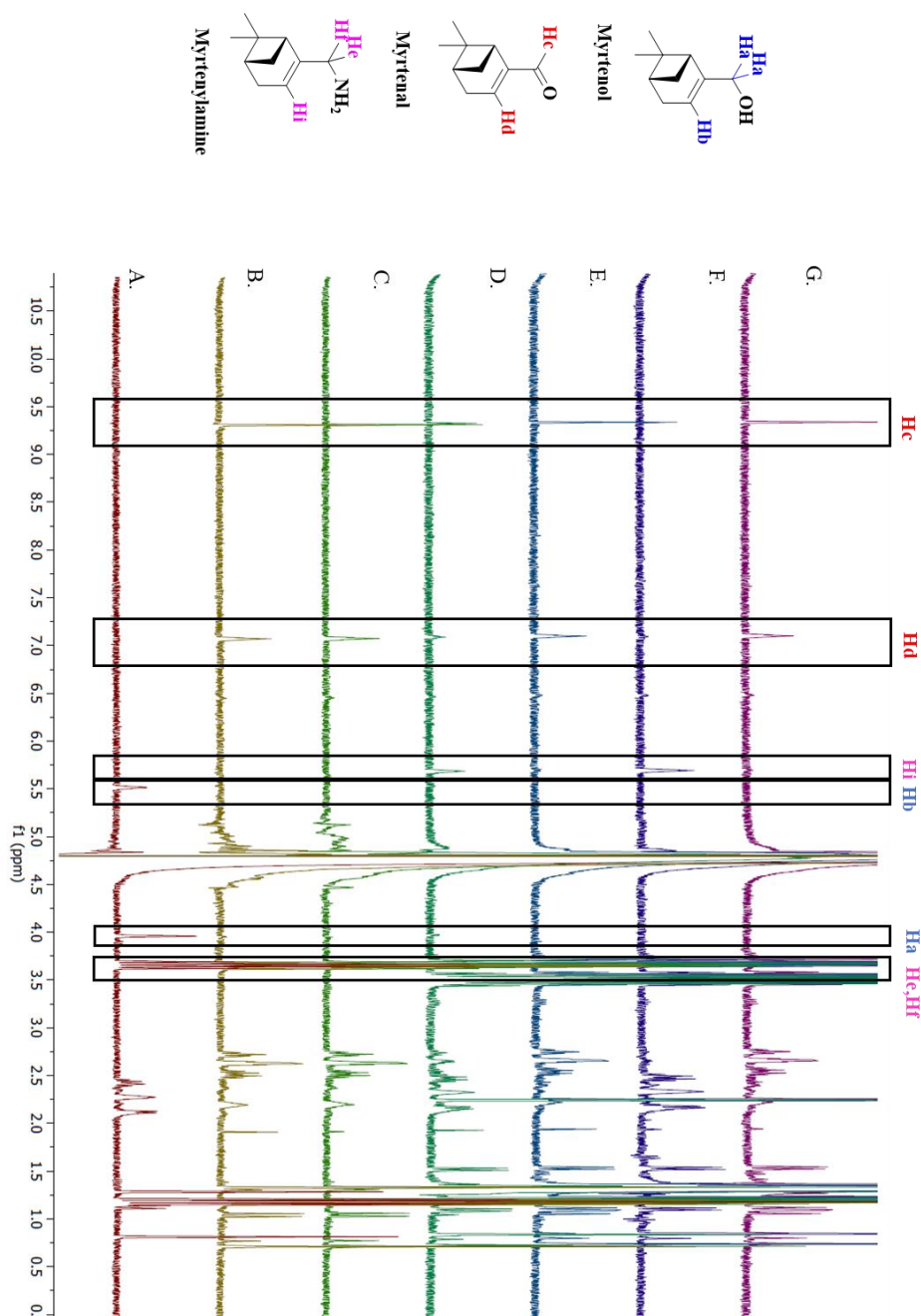


Figure 114 : RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) à t 48 h du procédé hybride 1P1S dans un tampon KH₂PO₄ pH 7.3 100 mM à 50°C sur 10 mM de myrténol avec 100 mM d'IPA comme donneur d'amine et 1mM de PLP. Une combinaison de 4 mg de catalyseur chimique et 200 µg de *Bm*-TA immobilisé sur 1 mg de EziGTMOPAL sont introduits dans des vials de GC de 2 ml et mis à tourner à 25 rpm à 50°C. **A.** Blanc de réaction (sans catalyseur) **B.** Blanc sans enzyme, Au@CeO₂ **C.** Blanc sans enzyme, Au@TiO₂ **D.** Au@CeO₂ + *Bm*-TA immobilisé **E.** Au@CeO₂ + *Bm*-TA libre **F.** Au@TiO₂ + *Bm*-TA immobilisé **G.** Au@TiO₂ + *Bm*-TA libre.

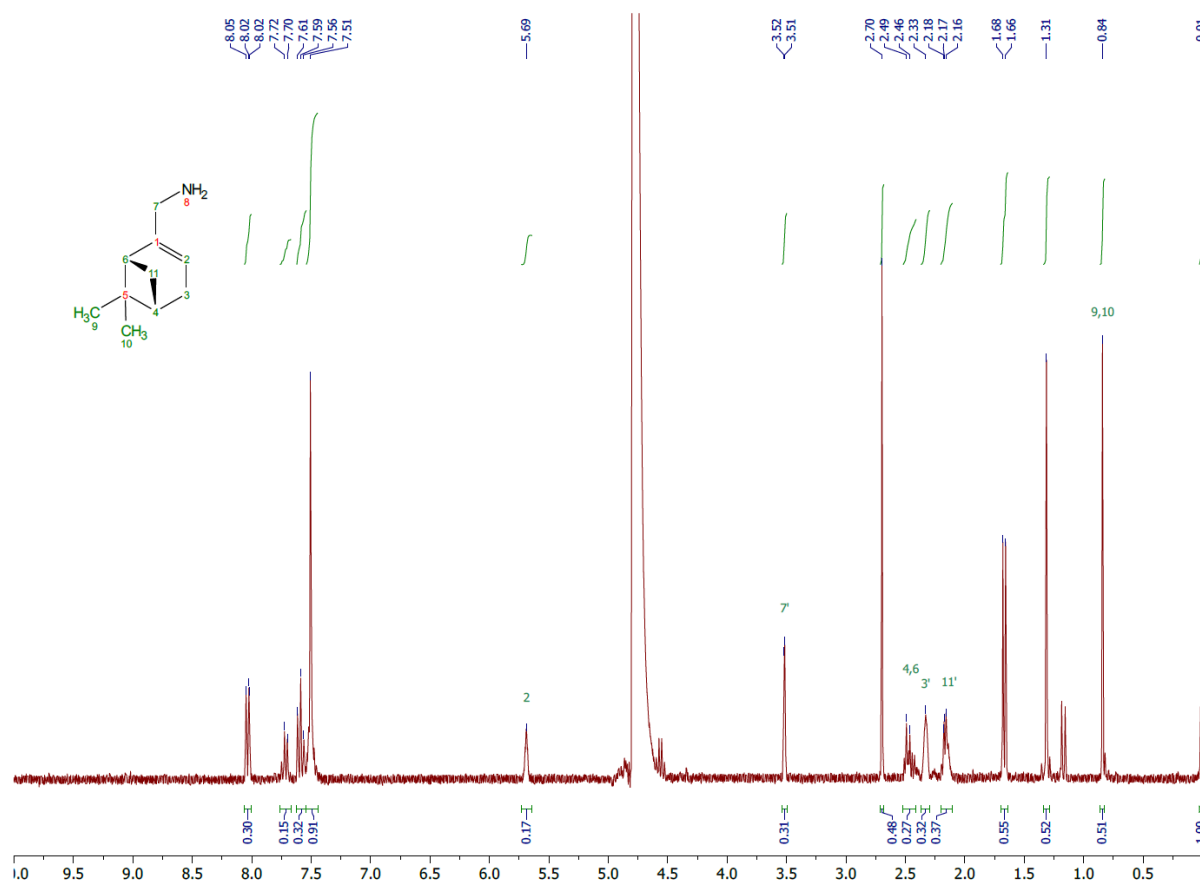


Figure 115 : Spectre RMN ¹H (D₂O, 300 MHz) de la myrténylamine.

Annexes E – Déplacements chimiques RMN**Dérivés d'oxydations :**

HMF: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): 4.64 ($-\text{CH}_2\text{OH}$, 2H, s), 6.69 (2H, d), 7.53 (1H, d), 9.46 (1H, s).

HFCA: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): 4.63 (2H, s), 6.48 (1H, d), 6.96 (1H, d)

DCAF: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) 7.62 (2H, s), 9.59 (2H, s).

AFCA: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) 7.14 (1H, d), 7.55 (1H, d), 9.46 (1H, s).

FDCA: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): 7.02 (2H, s)

Dérivés aminés :

HMFA: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): 4.20 ($-\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2H, s), 4.59 ($-\text{CH}_2\text{OH}$, 2H, s), 6.41 (1H, d), 6.53 (1H, d). ^{13}C (DEPT 45, D_2O , 300 MHz): 37.43, 55.78, 106.79, 109.06; ^{13}C (DEPT 135, D_2O , 300 MHz) 37.43, 55.78, 106.79, 109.06; HSQC (D_2O , 300 MHz): 3.78, 55.78 (CH_2OH); 4.55, 37.43 (CH_2NH_2); 6.23, 106.79; 6.35, 109.06

AMFA: 4.35 ($-\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2H, s), 6.77 (1H, d), 7.53 (1H, d), 9.49 (1H, S).

AMFC: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) 4.24 (2H, s), 6.59 (1H, d), 7.17 (1H, d). ^{13}C (DEPT 45, D_2O , 300 MHz): 38.41, 115.46, 118.63; ^{13}C (DEPT 135, D_2O , 300 MHz) 35.36, 112.52, 115.73; HSQC (D_2O , 300 MHz): 4.29, 38.41 (CH_2NH_2); 6.64, 115.46; 7.00, 118.63

Donneur d'amines et co-produit carbonylés :

(S)-MBA: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): 1.55 (3H, d), 4.44 (1H, q), 7.39 (5H, m)

Acetophenone: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): 2.68 (3H, s), 7.58 (2H, d), 7.69 (1H, m), 8.00 (2H, d)

Iso-propylamine: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): 1.31 (6H, d), 3.50, (1H, m)

Acetone: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): 2.25 (6H, s)

Molécules valorisées :

Myrténol: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 0.84 (3H, s), 1.13 (1H, d), 1.32 (3H, s), 2.15 (2H, m), 2.31, (2H, m), 2.48 (2H, m), 3.97 (2H, s), 5.51 (1H, s)

Myrténal: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): 0.73 (3H, s), 1.04 (1H, d), 1.33 (3H, s), 2.20 (1H, m), 2.52 (1H, m), 2.63 (2H, m), 2.74 (1H, m), 7.07 (1H, s), 9.31 (1H, s)

Myrténylamine: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 0.83 (3H, s), 1.15 (1H, d), 1.30 (3H, s), 2.14 (2H, m), 2.32 (2H, m), 2.48 (1H, m), 3.52 (2H, s), 5.69 (1H, s)

Acide kojique : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 4.50 (2H, s), 6.55 (1H, s), 8.00 (1H, s)

Acide coménique : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 6.97 (1H, s), 7.75 (1H, s)

1,6-hexanediol: ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): 1.24 (4H, m), 1.45 (4H, m), 3.51 (4H, t)

Acide adipique : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 1.45 (4H, m), 2.09 (4H, t)

Hexaméthylénediamine : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 1.31 (4H, m), 1.52 (4H, m), 2.78 (4H, t)

1,5-pentanediol : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 1.28 (4H, m), 1.46 (4H, m), 3.51 (2H, m)

Acide 1,5-dipentanoïque : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 1.46 (2H, m), 2.10 (4H, t)

1,5-diaminopentane : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 1.36 (2H, m), 1.54 (4H, m), 2.45 (4H, m)

Furfuryl alcohol : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 4.57 (2H, s), 6.41 (1H, d), 6.44 (1H, d), 7.52 (1H, s)

Furfural aldehyde : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 6.66 (1H, d), 7.47 (1H, d), 7.83 (1H, d), 9.39 (1H, s)

Acide furanoïque : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 6.46 (1H, d), 6.90 (1H, d), 7.42 (1H, d)

Furfurylamine : ^1H NMR (D_2O , 300 MHz) : 4.21 (2H, s), 6.41 (1H, d), 6.44 (1H, d), 7.52 (1H, s)

« **Publication** »

Hybrid conversion of 5-hydroxymethylfurfural to 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid: toward new bio-sourced polymers

Hybrid conversion of 5-hydroxymethylfurfural to 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid: toward new bio-sourced polymers

Antoine Lancien,^[a] Robert Wojcieszak,^[b] Eric Cuvelier,^[b] Matthieu Duban,^[a] Pascal Dhulster,^[a] Sébastien Paul,^[b] Franck Dumeignil,^[b] Renato Froidevaux*,^[a] and Egon Heuson*,^[a]

- [a] A. Lancien, Dr. M. Duban, Prof. P. Dhulster, Prof. R. Froidevaux, Dr. E. Heuson
Univ. Lille, INRA, ISA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394, Joint Research Unit BioEcoAgro – ICV- Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France
E-mail: egon.heuson@univ-lille.fr, renato.froidevaux@univ-lille.fr
- [b] Dr. R. Wojcieszak, E. Cuvelier, Prof. S. Paul, Prof. F. Dumeignil
Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, ENSCL, Univ. Artois, UMR 8181 - UCCS - Unité de Catalyse et Chimie du Solide, F-59000 Lille, France

Abstract: Hybrid catalysis, which combines chemo- and biocatalytic benefits, is an efficient way to address *green chemistry* principles. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) is a versatile building block in numerous industrial applications. To date, few studies have described the production of its amine derivatives and their polymers. Finding a good methodology to directly transform HMF to 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid (AMFC) therefore represents an important challenge. After selecting the best oxidation catalyst for HMF conversion to 5-aldehyde-2-furancarboxylic acid and immobilizing a transaminase onto a solid carrier, we implemented the first one-pot/two-steps hybrid catalytic process to produce AMFC (77 % yield); this is the most efficient AMFC catalytic production method from HMF reported to date. This process also produced 2,5-furandicarboxylic acid (21 % yield) as a major secondary product that can be applied to polymer syntheses such as polyethylene furanoate. Herein, we report a novel way to access new biosourced polymers based on HMF oxidized and aminated derivatives.

Introduction

The development of greener chemical processes is now recognized as a priority. The rarefaction of fossil resources combined with climate change issues impose the complete rethinking of our consumption habits and production models. Since the formalization of the concept of *green chemistry* by Anastas and Warner,¹⁰ chemists have been looking for alternative syntheses that are more efficient, less energy consuming, economically sustainable, and more environmentally friendly. Catalytic processes can fulfill most of these requirements; however, they are traditionally based on the use of a single chemo- or biocatalyst, thus only enabling a relatively limited range of reactions. Multicatalytic cascade-type systems have also been studied, with numerous successful examples expanding the scope of the achieved reactions. Still, they mostly concentrate on the same types of catalysts, namely chemo- and biocatalysts. Combining these two catalyst types would further expand the reaction variations. The number of studies reporting such combinations has recently increased and the variety of new accessible chemicals is continuously broadening.^[2] This is especially observed in the synthesis of asymmetric compounds through different methodologies such as dynamic kinetic

resolution processes.^[3] Still, the industrial application of these reactions is often very limited owing to their difficulty of implementation. The main challenge lies in finding catalysts that do not inhibit each other and of more importance, in establishing operating conditions that retain the activity of both catalysts. To circumvent such issues, the catalysts are most often used in different successive steps,^[4] or isolated from each other through compartmentalization *via* various methods including two-phase systems communicating through liquid/liquid or solid membranes^[3b,5] and whole-cell encapsulation of one of the two catalysts.^[6]

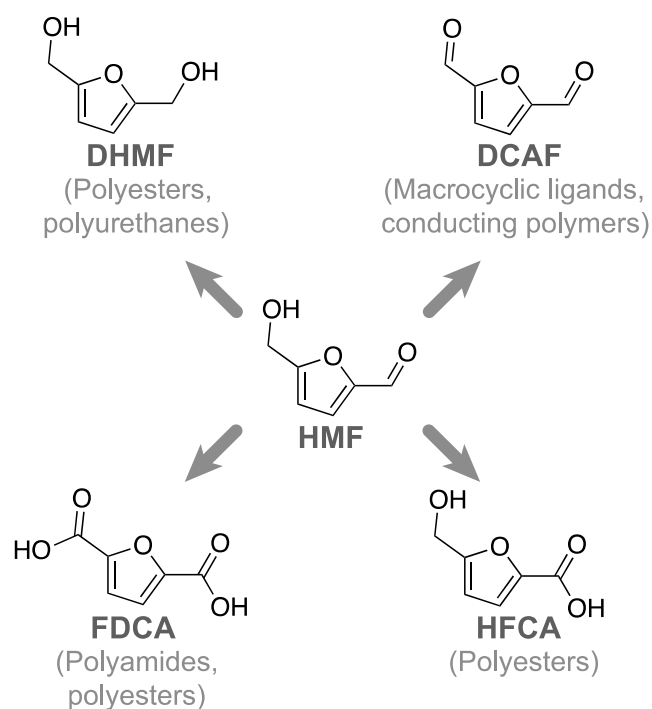
To address these catalyst combination issues, the novel research field "*hybrid catalysis*" has recently emerged. It involves the concomitant use of a chemo- and biocatalyst in a single pot, to realize multiple successive reactions.^[7] Under one of its simplest forms, a hybrid catalytic reaction combines two soluble catalysts, usually comprising an organocatalyst + biocatalyst. The first examples of such a combination were reported in the early 2000s. In 2003, Schoevaert *et al.* combined *L*-proline as an organic chemocatalyst with a *D*-galactose oxidase and Pt/C hydrogenation catalyst and employed this hybrid catalyst in the synthesis of 4-deoxy-*D*-glucose derivatives from *D*-galactose in a one-pot/three-steps process.^[8] One year later, Edin *et al.* described the synthesis of enantiomerically pure acetylated aldols by combining aldolization with acetylation, catalyzed respectively by an (*S*)-proline and lipase.^[9] These examples mainly established the compatibility between biocatalysts and some organocatalysts, subsequently leading to numerous other applications.^[2c,2d,7] Heterogeneous chemo- and biocatalysts can also be advantageously combined; however, literature on such methods is scarce. The first example was reported in 1980 with the combination of a glucose isomerase and, once again, a Pt/C chemocatalyst applied for the preparation of *D*-mannitol.^[10] Following these reports, a few successful examples of heterogenocatalytic hybrid pathways have been described where at least one of the two catalysts is supported on a solid carrier.^[11] The heterogeneous hybrid approach offers the main advantage of considerably simplifying the purification processes by facilitating catalyst separation from the reaction medium.

The hybrid catalysis concept is particularly relevant in the context of biorefineries, with biomass as an alternative feedstock to petroleum for production processes, *e.g.* chemicals,^[12] with the catalytic production of a large number of compounds.^[13] Among

them, 5-hydroxymethylfurfural (HMF) is described as one of the most important biobased platform molecules^[14] with various production processes.^[13c,15] A two-pots/one-step hybrid catalytic pathway was recently reported by Gimbernat *et al.* for HMF production from *D*-glucose in a triphasic compartmentalized reactor.^[5a]

This product can be transformed into a variety of value-added building blocks,^[16] including monomers for the polymer production of 2,5-dihydroxymethylfuran (DHMF), 2,5-dicarboxaldehydefuran (DCAF), 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid (HFCA), and 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA; Figure 1), which interestingly can be obtained through both bio- and chemocatalysis.^[17]

Figure 1. Valorization of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) into 2,5-dihydroxymethylfuran (DHMF), 2,5-dicarboxaldehydefuran (DCAF), 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid (HFCA), and 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA) as building blocks for biobased polymers (applications indicated in brackets).



With the same mindset, furfurylamines have also been described as interesting precursors for biobased polymers including polyamides, polyimides, polyaspartimides, polyureas, polyhydroxyurethanes, polyimines, and polyenamines, with their monomers being readily synthesized from biosourced furfural derivatives.^[18] These compounds also have several applications including the preparation of benzoxazine derivatives for flame-retardant resins^[19] and, after conversion to difurfuryl diisocyanates, the replacement of petroleum-based diphenylmethane diisocyanate in polyurethane systems.^[20] Furfurylamines are most commonly obtained *via* the reductive amination of the carbonyl moiety of the furfural group,^[21] under mild conditions with inexpensive reagents. However, such processes often require the use of protecting groups, numerous chemical steps, and toxic reductive agents.^[21,22] To circumvent

these issues, several chemocatalytic pathways have been recently developed;^[21,22,23] however, these are not ideal for the synthesis of furfurylamines deriving from HMF, owing to the sensitivity of the furan ring to reductive conditions and the tendency of these compounds to form secondary and tertiary amines.^[17,23g,24] An efficient alternative to perform reductive amination of HMF derivatives is the use of transaminases, already largely described for carbonyl group amination,^[25] for the efficient conversion of carbonyl moieties to primary amines in water at a low temperature. Recently, several ω -transaminases were employed for the synthesis of several furfurylamines from HMF derivatives.^[24,26] Dunbabin *et al.* reported yields $\leq 92\%$ for the aminated products, starting from different HMF and furfural derivatives. Among them, they achieved the synthesis of 5-hydroxymethylfurfurylamine (HMFA), 5-aminomethyl-2-furancarboxaldehyde (AMFA), furan-2,5-diylidimethanamine (FDMA), and 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid (AMFC; Figure 2). However, in the case of AMFC, they performed the synthesis directly on 5-aldehyde-2-furancarboxylic acid (AFCA) instead of HMF, owing to the absence of a prior oxidation step for the production of this intermediate in the reaction medium. Evidently, the only amine that can be directly produced from HMF is HMFA. Indeed, the synthesis of AMFA, FDMA, and AMFC requires a prior oxidation step to yield an aldehyde or carboxylic acid group from the hydroxyl moiety. For FDMA, the double aminated compound, this step should be preferably performed prior to the transaminase action as the two carbonyls could then be converted concomitantly by the enzyme. While HMFA has proven to be useful for several applications (such as the preparation of diuretics, antihypertensives, and antiseptic and curing agents), AMFA and AMFC are very promising building blocks for polymer synthesis, owing to the presence of the aldehyde and carboxylic acid groups. AMFA can be used to form imine-based polymers based on a self-condensation mechanism, while AMFC, as an amino acid, can be used to produce unnatural peptides such as cyclopeptides.^[27] These compounds are of great interest because of their considerable bioactivity. Surprisingly, very few studies have reported the successful synthesis of these two compounds and thus, finding a methodology to produce them in larger quantities would certainly help develop their use in polymer synthesis. Herein, we report the first combination of an oxidative metal chemocatalyst and a transaminase, as a heterogeneous hybrid catalytic one-pot/two-steps process, for the successful synthesis of AMFC from HMF (Figure 3). This strategy is based on a first step comprising the oxidation of HMF into AFCA by the chemocatalyst to generate the substrate required for the following transamination step to produce AMFC using an amine donor. The choice of a hybrid system, using a chemocatalyst instead of an enzyme, was motivated by the ability of our catalyst to directly use molecular oxygen for the oxidation step instead of an expensive cofactor/co-substrate, despite the complexity of making these two catalysts work in the same reaction mixture. Therefore, such a system should be more easily transposable to industrial considerations. The first realization of this innovative process ended in the complete conversion of HMF in 52 h to produce AMFC in 77 % yield. Additionally, FDCA was produced as major byproduct with a yield of 21 %.

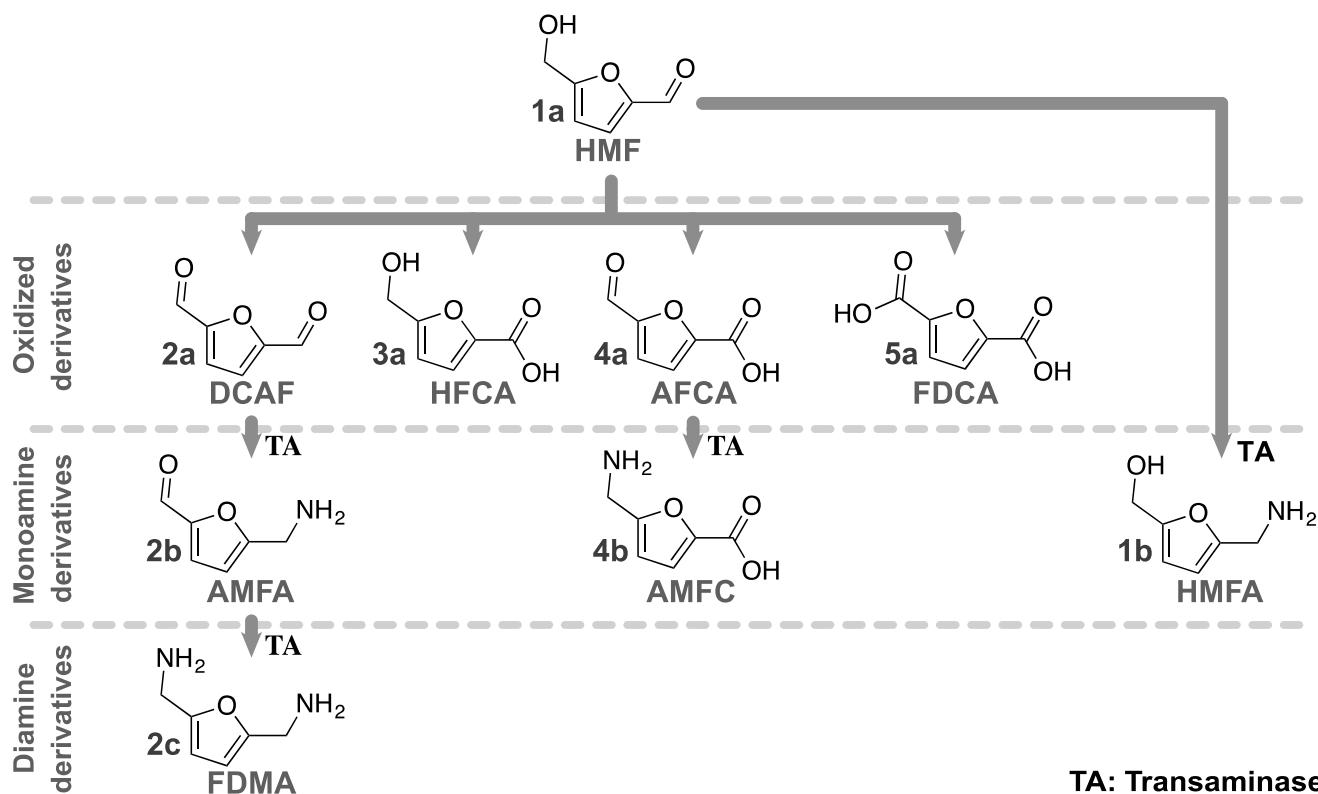


Figure 2. Chemical compounds obtained from: 1) oxidation of the hydroxyl and carbonyl groups of 5-hydroxymethylfurfural (HMF, **1a**), 2,5-dicarboxaldehydefuran (DCAF, **2a**), 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid (HFCA, **3a**), 5-aldehyde-2-furancarboxylic acid (AFCA, **4a**), and 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA, **5a**) and 2) reductive amination of the corresponding carbonyl derivatives [5-hydroxymethylfurfurylamine (HMFA, **1b**), 5-aminomethyl-2-furancarboxaldehyde (AMFA, **2b**), 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid (AMFC, **4b**), and furan-2,5-diylidimethanamine (FDMA, **2c**)]. Some of these reductive aminations were recently performed with enzymes, especially with transaminases (TA), in one-step reactions, helping for the development of greener processes.

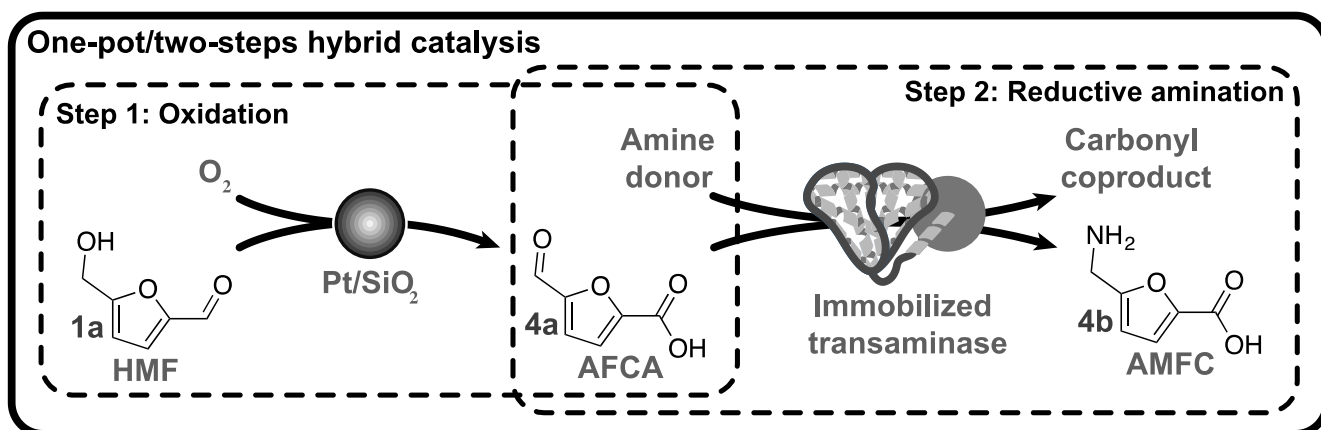


Figure 3. One-pot/two-steps hybrid catalytic process for the direct synthesis of 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid (AMFC) from 5-hydroxymethylfurfural (HMF) combining a heterogeneous metal oxidative catalyst and an immobilized transaminase.

Only traces (<1 %) of HFCA could be detected at the end of the process, proving its efficiency for the synthesis of biobased polymer precursors. Notably, respective AMFC and FDCA yields of 67 and 20 % could be recovered after purification without further optimization.

Results and Discussion

Chemocatalyst screening

To achieve the conversion of **1a** to **4b**, the reaction pathway must first proceed through the production of **4a** under a first oxidation step. The oxidative metal catalysts were therefore first screened on **1a** to evaluate their ability to produce **4a** selectively at 60 °C in a phosphate buffer at pH 8, the conditions required for transaminase activity during the second step of the reaction, with sole molecular oxygen as the oxidant. In total, 15 heterogeneous

metal catalysts were screened on **1a** at small scale (1 mL), in glass sealed vials, to limit evaporation. The tested catalysts, which were selected according to their ability and versatility to oxidize short-chain alcohols are listed in Table 1.^[28]

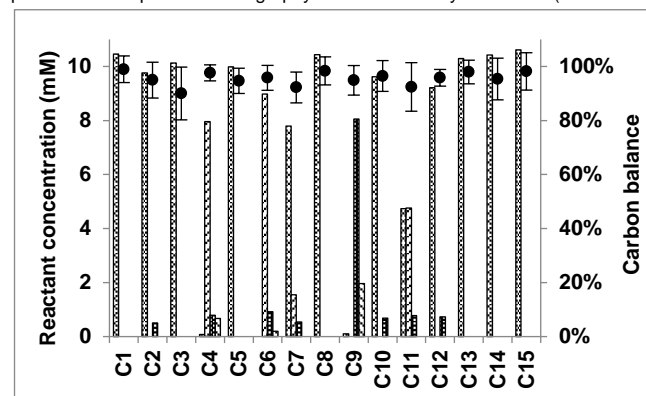
Table 1. Oxidation catalysts screened for the conversion of **1a** to **4a**.

Catalyst code name	Method of preparation	Metal content (ICP)	Support
C1	Reduction-precipitation	2.3 % Au	Al ₂ O ₃
C2	Sol immobilization	1.8 % Au	Amberlyst
C3	Sol immobilization	1.6 % Au	CaO
C4	Sol immobilization	1.6 % Au _{PVA}	CaO
C5	Sol immobilization	1.8 % Au	CeO ₂
C6	Sol immobilization	1.8 % Au	MgO
C7	Reduction-precipitation	1.7 % Pd	Al ₂ O ₃
C8	Sol immobilization	0.9 % Pd	TiO ₂
C9	Wet impregnation	6.3 % Pt	SiO ₂
C10	Wet impregnation	1.5 % Ru	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
C11	Sol immobilization	0.9 % Au – 0.1 % Pd	TiO ₂
C12	Sol immobilization	0.3 % Au – 0.7 % Pd	ZrO ₂
C13	Co-precipitation	0.8 % Au – 0.8 % Pt	TiO ₂
C14	Co-precipitation	0.7 % Pt – 0.8 % Pd	Al ₂ O ₃
C15	Co-precipitation	1.0 % Pt – 1.0 % Pd	TiO ₂

The catalytic test results are presented in Figure 4. The results revealed that the 7.68 μmol O₂ contained in the 1 mL gas phase were sufficient to oxidize **1a** over several catalysts. As a result, catalysts C1, C3, C5, C8, C13, C14, and C15 were found inactive, while the rest of the catalysts formed at least one oxidation product: **3a**, **4a**, and/or **5a** (Figure 4). Interestingly, no **2a** could be detected despite it being one of the first two oxidative products of **1a**. Catalysts C4, C6, C7, and C11 afforded 8.0, 9.0, 1.5, and 4.8 mM of **3a**, respectively, after 24 h. On the other hand, despite the complete conversion of **1a** with C4 and C6, these two catalysts afforded low amounts of **4a** at the concentrations 0.8 and 0.9 mM. Similar concentration levels were obtained with C7 and C11, with 0.5 and 0.9 mM respectively. This suggests that under the proposed conditions, these catalysts favor the conversion of the aldehyde **1a** to a carboxylic acid moiety over that of the alcohol to an aldehyde moiety, which here remains the limiting step. This was confirmed by the concomitant production of **5a** and **4a** with C4 and C6 at the concentrations 0.7 and 0.2 mM, respectively. Consequently, while the amount of **4a** produced was significant, C4 and C6 were considered poor candidates for the cascade reaction, as the yield of the second step would remain limited under these conditions, even with the

complete consumption of **1a**. In contrast, C2, C10, and C12 selectively led to **4a** at the respective concentrations 0.5, 0.7, and 0.7 mM. This suggested that for these catalysts, the limiting step was the conversion of the aldehyde group into carboxylic acid, thereby leading to the straightforward conversion of **3a** to **4a**. Still, the very low amount of **4a** produced in 24 h was not encouraging. The most efficient catalyst for the production of **4a** was Pt/SiO₂ (C9), with full conversion of HMF after 24 h and the production of 8.1 and 2.0 mM **4a** and **5a**, respectively. The absence of **3a** suggests a reaction pathway similar to that observed over C2, C10, and C11, with conversion of the aldehyde into the acid as the limiting step. With a yield of **4a** of >80 % after 24 h, C9 was selected for the subsequent hybrid process.

Figure 4. Concentrations of **1a**, **3a**, **4a**, and **5a** measured by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD)



after reaction for 24 h, at 60 °C, over the 15 selected chemocatalysts. The screening was performed in 1 mL of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8) in ultra-pure water on 10 mM **1a**, with 2 mg chemocatalyst. Carbon balances (●) were calculated for each catalyst.

Transaminase activity towards the potential oxidized products

The activity of *Chromobacterium violaceum* transaminase (Cv-TA) toward the different potential substrates present in solution was next evaluated using a lactate dehydrogenase (LDH) assay based on alanine as the amine donor for transamination.^[29] This led to the production of pyruvate as a carbonyl co-product, which was subsequently reduced to the lactate by LDH with a molecule of NADH. The conversion of this latter molecule to NAD⁺ was detected by UV spectrophotometry at 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, pH 8), which thus allowed the determination of the reaction advancement. First, the activity of Cv-TA toward **1a** was measured to assess its possible competition with the chemocatalyst used to produce **4a**. Such a transamination reaction would lead to the production of **1b**, which may not be oxidized by the chemocatalyst and would thus result in a decrease in the yield of **4b**. An activity of 10.7 mUI.well⁻¹ was observed, indicating a specific activity of 535 mUI.mg⁻¹ of cell-free extract (CFE). The activity towards **4a**, the intermediate compound of the hybrid reaction, was then investigated under the same conditions. Thus, 14.3 mUI.well⁻¹ (715 mUI.mg⁻¹ CFE) was measured with the LDH assay. Finally, the ability of the transaminase to accept **2a** as a substrate was also evaluated. Here, 10.9 mUI.well⁻¹ was measured for this substrate, leading to a specific activity of 545 mUI.mg⁻¹ Cv-TA CFE.

To fit the experimental conditions previously defined during the chemocatalysis screening step, the activity of Cv-TA toward **4a** at

60 °C was next investigated. The results revealed that 43 % **4a** was converted at 60 °C in 90 min, while 62 % conversion of **4a** to **4b** was achieved in 90 min at 30 °C (Figure SI 1). Notably, this low yield was probably due to the absence of equilibrium shifting methodology application in this assay, as LDH was only added after sampling because of its instability at 60 °C. The final yield therefore reflects the equilibrium constant of the reaction for these substrate couples. The rapid formation of a blurry precipitate was also observed in the mixture at 60 °C suggesting enzyme precipitation, while no precipitate was observed at 30 °C.

Following the evaluation of Cv-TA activity toward the different substrates of the reaction, the synthesis of **4b** from **4a** was performed at small scale to evaluate the ability of the enzyme to successfully convert the intermediate of the final hybrid reaction. Notably, this synthesis was already described by Dunbabin *et al.* with several TAs,^[24] including Cv-TA, using methylbenzylamine (MBA) and isopropylamine (IPA) as the amine donors. These two donors are known to shift the reaction equilibrium. In their study, Dunbabin *et al.* reported 47 and 88 % yields for the transamination of **4a** to **4b** with both donors, respectively. In this study, we performed these tests on the **4a** acceptor using both MBA and IPA donors. Although MBA presents a molecular weight equivalent to our desired product, a 1:1 ratio with the **4a** acceptor was used to fulfill at best the principles of *green chemistry*. With the Cv-TA being strictly (S)-enantioselective, (S)-MBA was used as the pure enantiomer in this study. The reaction led to the quantitative production of **4b** in 5 h. This demonstrates the Cv-TA efficiency in producing **4b** under these conditions. With IPA, a 1:1 ratio was also first tested; however, the conversion yield remained low (<7 %) after 4 h of transamination (Figure SI 2). Thus, a 100:1 ratio was next tested, and the quantitative production of **4b** could be observed in only 4 h under these conditions. While this high donor/acceptor ratio is commonly reported throughout the literature for transaminase synthesis with IPA, we are fully aware that using such an amount of donor does not respect the principles of *green chemistry*. Therefore, as will be described later in this study, when using IPA as donor, our processes used a 10:1 donor/acceptor ratio to head in this direction. Under such conditions, a quantitative production of **4b** could also be achieved. Because they are not commercially available, the syntheses of **1b** and **2b** by the transamination of the corresponding carbonyls (**1a** and **2a**, respectively) were also tested to serve as reference compounds for the HPLC analysis. In this case, sole MBA was used as the donor in a 1:1 ratio. Compound **1b** could be obtained quantitatively from **1a**. For **2b** production, the product could not be purified after the reaction was terminated. However, the HPLC data revealed complete conversion of **2a** in 2 h, leading to the production of an amine product that was assumed to be **2b**. Interestingly, a small quantity of a second amine product was also detected. Considering that **2a** possesses two carbonyl moieties, we assumed that this second compound was probably **2c**. However, because the production of **2a** was not detected during the chemocatalyst screening, no production of **2b** and **2c** was expected during the hybrid catalytic synthesis. Thus, no further syntheses of these two standards were attempted.

Cv-TA immobilization

The immobilization of Cv-TA was then performed on a solid carrier. For this purpose, we selected the EziGTM carrier (EnginZyme AB, Sweden), which was described in 2014 by Cassimjee *et al.* as an efficient immobilization support for Cv-TA

with higher stability in organic solvents.^[30] The use of this carrier was very recently extended to several other enzyme classes by Thompson *et al.*^[31] This carrier is available under three different forms with three different polymer coatings, namely, the EziGTM hydrophilic OPAL, semi-hydrophilic AMBER, and hydrophobic CORAL. Thus, to select the most efficient carrier for the enzyme, all forms were tested. The Cv-TA was immobilized directly from the CFE in the presence of a slight amount of its cofactor, pyridoxal phosphate (PLP), to maintain a good folding of the enzyme. Interestingly, after the immobilization and washing steps, the carrier turned yellowish, even when no CFE was used, suggesting a strong affinity for PLP.

First an evaluation of the best enzyme/carrier ratio was performed with each EziGTM. In total, six different w/w ratios were tested (1:1, 1:3, 1:6, 1:9, 1:12, and 1:15), with an immobilization incubation time of 1 h (Figure SI 3). After measurement of the remaining protein concentration in solution, 50 % of the protein immobilization could be determined with a 1:3 ratio. The immobilization rate could be increased up to 80 % with EziGTM OPAL with a 1:15 ratio, while 85 and 88 % protein immobilization could be respectively obtained with EziGTM CORAL and AMBER. However, no significative evolution could be observed between the ratios 1:9 and 1:15. To reduce the amount of carrier used to set up the processes, the 1:3 ratio was selected. As described later in this study, this ratio was found sufficient to complete the transamination step in only 4 h. The immobilization incubation time was also verified. Protein immobilization rates were measured with the three carriers and a 1:3 ratio, over 3 h (Figure SI 4). No significative evolution could be observed after 60 min of incubation for the EziGTM OPAL, with 60 % maximum protein loading. For the EziGTM CORAL and AMBER, the maximum protein loadings were 66 and 59 %, respectively, after 2 h. Based on these results, a 1:3 enzyme/carrier ratio was selected, with an incubation time of 1 h.

Following these preliminary experiments, the activities of Cv-TA@EziGTM OPAL, CORAL, and AMBER were measured with **4a** as the acceptor and alanine as donor, to select the best carrier for the process. The reaction advancement was followed spectrophotometrically and the conversion of **4a** into **4b** was confirmed by HPLC. The best carrier was EziGTM OPAL, with 61 % conversion of **4a** into **4b** in 60 min (Figure SI 5). Interestingly, this yield, corresponding to the one measured during the thermoactivity assays with alanine, was reached after 30 min of reaction. EziGTM AMBER and CORAL both reached 46 % conversions in 60 min and only 35 % in 30 min. Based on these results, the activity of Cv-TA@EziGTM OPAL was tested at 60 °C under the previously used conditions. In this case, only 37 % conversion was achieved after 60 min (Figure SI 6). In fact, 34 % conversion of **4a** was observed after the first 10 min of reaction but no further conversion was observed thereafter. This confirms the instability of Cv-TA at this temperature and demonstrates that its immobilization on the EziGTM carrier materials does not help protect the enzyme from denaturation. Having achieved the best conversion yields with the EziGTM OPAL carrier, the recyclability of Cv-TA@EziGTM OPAL was also tested. MBA in a 1:1 ratio was this time used as donor to mimic the final conditions of the hybrid process. As expected, 100 % conversion was measured after 5 h of reaction during the first cycle (Figure SI 7). The second transamination cycle was performed after the Cv-TA@EziGTM OPAL was kept at 4 °C for 16 h. This time, only 30 % conversion was achieved in 5 h, and full conversion could be obtained after 24 h. This shows the instability of Cv-TA, even

when immobilized on the EziG™ OPAL carrier. A last cycle was performed right after the second transamination cycle. This time, 13 % conversion was achieved in 5 h, and full conversion could be obtained after 72 h. Consequently, the immobilization of Cv-TA on EziG™ OPAL is only advantageous for the easy removal of the catalysts and a simplified purification of the reaction products.

In conclusion of this part of the study, EziG™ OPAL was selected as the carrier for the transaminase immobilization for further use in the hybrid process. Considering the significant loss in the Cv-TA@EziG™ OPAL activity at 60 °C, a temperature of 30 °C was selected as the optimal temperature for the transamination step in the final hybrid process for the production of **4b**. Because the selected chemocatalyst was effective at 60 °C, the process was performed as a one-pot/two-steps reaction with a short cool down between the two reaction steps. Under these conditions, no recycling of the catalysts was expected. However, the use of heterogeneous catalysts still eases the purification of the products.

One-pot/two-steps heterogeneous hybrid reaction

According to the optimization studies, the best chemocatalyst selected for the production of **4a** from **1a** and the immobilized enzyme effective for the subsequent conversion of the latter into **4b**, were employed in a one-pot/two-steps heterogeneous hybrid reaction. According to the previous results, this reaction was set up as follows in 10 mL total reaction volume (Figure 5): the first step was performed in sodium phosphate buffer (pH 8) at 60 °C using the Pt/SiO₂ catalyst. This step led to the production of **4a** from **1a**. After complete conversion of **1a**, the reaction mixture was cooled down to 25 °C and Cv-TA@EziG™Opal was added to the suspension together with (S)-MBA as the amine donor and PLP. After complete conversion of **4a** into **4b**, the products were purified and characterized.

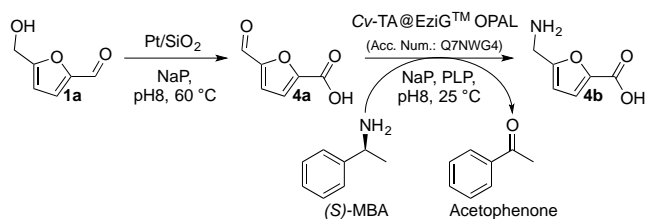


Figure 5. One-pot/two-steps hybrid heterogeneous catalytic process for the conversion of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) into 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid (AMFC), combining a Pt/SiO₂ chemocatalyst and *Chromobacterium violaceum* transaminase (Cv-TA). The first step was performed in sodium phosphate buffer, at pH 8 and 60 °C, on **1a** with Pt/SiO₂ as the catalyst. Once **1a** was entirely converted, the second step was initiated after a short cool down period at room temperature (25 °C) and performed with the addition of Cv-TA@EziG™ OPAL, the amine donor (S)-methylbenzylamine (MBA), and pyridoxal phosphate (PLP). This second step was then carried out in the same reaction mixture at 30 °C until complete conversion of **4a** into **4b** was attained.

Interestingly, complete conversion of **1a** was only observed after 48 h (Figure 6), despite the gas phase volume being proportionally identical to that used during the chemocatalyst screening step. However, in the case of the one-pot/two-steps reaction, the reaction volume was set to 10 mL to allow for more sampling, and considering the simple rotative agitation used, this

scale factor may have induced a change in catalysts mixing, resulting in kinetics variations. Additionally, small amount of **3a** could be detected during the reaction, with maximum of 0.9 mM (9 %) after 24 h of reaction, and was found completely consumed after 64 h. At this, only **4a** and **5a** were remaining in the reaction mixture, with 5.2 mM and 4.8 mM respectively. The transamination step was consequently initiated. After 4 h at 25 °C, complete conversion of **4a** into **4b** could be observed according to the previous transamination syntheses. After the transamination step, a yield of 53 % **4b** was obtained, with a final yield of 50 % after the purification step.

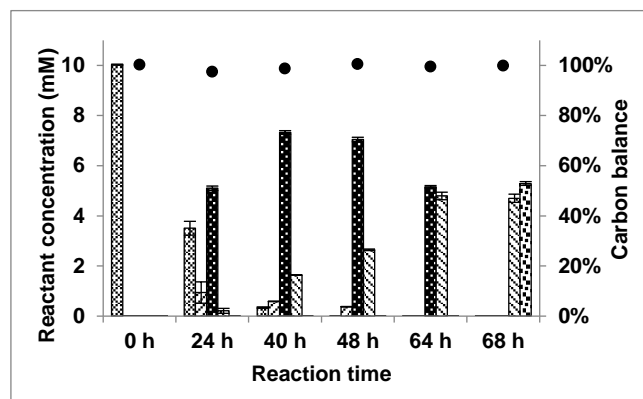


Figure 6. Concentrations of **1a**, **3a**, **4a**, **5a**, and **4b** measured by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD) after 0, 24, 40, 48, 64, and 68 h. The first oxidative chemocatalytic step was performed at 60 °C for 64 h in 10 mL sodium phosphate buffer at pH 8, on 10 mM **1a** and 20 mg Pt/SiO₂ (1/20 substrate/metal ratio). The mixture was then cooled to 25 °C and 10 mg of Cv-TA@EziG™ OPAL were added with 1 mL of 100 mM (S)-methylbenzylamine (MBA) and 500 μM pyridoxal phosphate (PLP) solution in ultra-pure water (10 mM and 50 μM final concentrations, respectively). The transamination was run over 4 h. Carbon balances (●) were calculated for each reaction time based on the average measured reactant concentrations.

Despite succeeding in the production of the desired **4b** product, with only **5a** as major impurity, according to the results obtained, it appeared to be possible to optimize the final **4b** yield by performing the transamination step earlier. A second experiment was consequently carried out in the same condition, and the transamination step was performed after 48 h where **4a** concentration was found at its maximum with 7.7 mM (77 %) produced (Figure SI 26). In this case, a complete conversion of **4a** into **4b** could again be observed, with a final yield of 77 % in **4b**. The **5a** final concentration was consequently found lower than during the first experiment with 21 % yield. The transamination step being performed earlier, a small quantity of **3a** could also be detected after the transamination step (1 %). This impurity could easily be removed from the two major products during the purification step, and a final yield of 67 % and 20 % could be recovered in **4b** and **5a**, respectively.

A third experiment, identical to the second one, was then performed to evaluate the possibility of using IPA instead of MBA as donor. As stated earlier, a 10:1 donor/acceptor ratio was used in this case, and a quantitative conversion of **4a** into **4b** was also observed in 4 h of transamination step (Figure SI 30). Notably, the same product profile was observed at each reaction time, while the FDCA concentration was slightly higher after 48 h, with 2.4 mM produced. Finally, 6.7 mM (67 %) **4b** and 2.7 mM (27 %) **5a** could be obtained. As observed previously, only 1 % **3a** was

detected at the end of the process. After purification, yields of 57 % **4b** and 20 % **5a** could be recovered.

With a complete consumption of **1a** in 48 h, this result represents the first methodology ever described for the synthesis of **4b** in a one-pot/two-steps process from this precursor. Notably, the overall yield obtained in 52 h of reaction (77 %) was substantially higher than that described by Dunbabin *et al.*, with MBA for the transamination step with Cv-TA (47 %) on one hand, but also with a more conventional organic synthesis approach (60 %) on the other hand. IPA could also be successfully used as amine donor for the process, with complete conversion of **4a** into **4b** in 4 h. This confirms that this approach represents an efficient way to synthesize **4b**. Additionally, the first reaction led to the production of 4.7 mM (47 %) **5a** as unique secondary product during the first experiment. While not being optimized in this objective, this new process could also represent an efficient way to produce **5a**, which remains one of the most interesting derivatives from **1a** as it can be used to produce another highly industrially valuable biobased polymer, the polyethylene furanoate (PEF). Particularly, as compounds **4b** and **5a** can be easily separated from each other by a simple liquid/liquid phase extraction process.

Conclusion

Briefly, we herein report the successful first one-pot/two-steps fully heterogeneous hybrid catalytic process for the direct production of AMFC from HMF. Among the 15 metal chemocatalysts tested, Pt/SiO₂ proved to be the most effective to convert HMF into AFCA, with 81 % yield in only 24 h, at 60 °C, in sodium phosphate buffer (pH 8). In parallel, Cv-TA was found to be efficient for the complete conversion of AFCA into AMFC in 4 h, at 30 °C, in sodium phosphate buffer (pH 8). To set up a fully heterogeneous process and aid product purification, the possibility of immobilizing the Cv-TA on EziG™ carrier was also studied. EziG™ OPAL material was found to be the best carrier, with almost full retention and maintenance of the Cv-TA activity at 30 °C in sodium phosphate buffer (pH 8). However, the immobilized enzyme could not be recycled over several synthesis cycles with already 70 % activity decrease during the second cycle. The combination of these two catalysts into a one-pot/two-steps process was successfully implemented with a maximum yield of 77 % in AMFC, and 67 % yield in product recovered after the purification step. To the best of our knowledge, this represents the highest yield ever reported for the production of AMFC through a catalytic process. Additionally, this process led to the formation of FDCA as major byproduct in all cases, which can easily be separated from AMFC by simple liquid/liquid extraction. This second compound serves, along with ethylene glycol, as a precursor for the synthesis of PEF, a new biobased polymer with industrial processes being currently validated for its high-scale production.

Experimental Section

Generalities

All chemicals were obtained from chemical suppliers and used as received unless otherwise stated. All the products were supplied by Sigma-Aldrich (Switzerland): 5-hydroxymethylfurfural, 5-aldehyde-2-furancarboxylic acid, 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid, 2,5-dicarboxaldehyde-furan, furan

dicarboxylic acid, lactate dehydrogenase from rabbit muscle (EC 1.1.1.27; LDH), nicotinamide adenine dinucleotide, 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate, deuterium oxide, isopropylamine, pyridoxal phosphate, sodium phosphate monobasic, L-alanine, (S)- α -methylbenzylamine, Bradford reagent, DOWEX 50WX8 100–200 mesh ion exchange resin, ammonium hydroxide solution (30 %), and Luria-Bertini broth. All analytical solvents were of HPLC/MS grade. Spectrophotometric measurements were performed on a Spectramax i3 (Molecular Devices, USA).

NMR analysis

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 25 °C using a Bruker Advance 300 spectrometer (Bruker, USA). The coupling constants were measured in Hertz (Hz) and multiplicities for ¹H NMR coupling were presented as *s* (singlet), *d* (doublet), *t* (triplet), and *m* (multiple). The chemical shift was presented relative to the sodium trimethylsilyl propanoate reference.

HPLC analysis

The reaction product analyses were performed on an Ultra-fast HPLC-DAD-MS-LCMS-2020 (Shimadzu, Japan), using a Brownlee Spheri-5 RP-18 (4.6 x 250 mm) cartridge column. Injection volumes of 10 μ L were used for all the samples. The water and acetonitrile elution phases contained 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA). Elution was carried out at 0.5 mL.min⁻¹, with a 30 °C oven temperature for the column. The elution profile was as follows: 15 min of 100 % water phase, followed by the progressive shifting of the water phase toward 100 % acetonitrile phase in 2 min. The 100 % acetonitrile phase was held for 2 min and then shifted again to 100 % water phase in 2 min. The 100 % water phase was held until the end of the run, with a total run time of 25 min, to equilibrate the column and attain a stable pressure for the next injection. The products were detected at three different wavelengths, namely 215, 245, and 280 nm. The reaction products were detected at the following retention times and wavelengths: **4b**: 8.2 min/245 nm, **1b**: 9.46 min/210 nm, **3a**: 12.2 min/245 nm, **4a**: 13.2 min/280 nm, **5a**: 13.8 min/245 nm, **1a**: 14.5 min/280 nm, and **2a**: 16.6 min/280 nm. The HPLC-DAD calibration curves of these compounds are illustrated in Figures SI 14, 13, 10, 11, 12, 8, and 9, respectively.

Chemocatalyst syntheses

The 15 catalysts described in this paper were synthesized using the following four different approaches according to the methods listed in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

Reduction-precipitation (C1, C7)

The chemical reduction of the catalyst with hydrazine was performed in deionized water in a 110 cm³ three-necked reaction flask immersed in a thermostatic water bath. The reaction flask was fitted with a reflux condenser and a thermocouple to control the reaction temperature. A suspension of the gold precursor [tetrachloroauric (III) acid, Sigma Aldrich, <99 %] and the support (1 g Al₂O₃ in 60 cm³ distilled water) was stirred for 0.5 h at room temperature. The reaction mixture was then heated slowly from 25 to 50 °C and 2 mL 80 % aqueous hydrazine (Sigma Aldrich, <99 %) was subsequently added (N₂H₄/H₂O ratio: 0.3/5). The pH of the solution was 12 and remained almost constant and the reaction was complete after 1 h. After reduction, the solid was filtered, washed with distilled water, and dried in air at 100 °C for 16 h. The final Au loading was determined by inductively coupled plasma-optic (ICP) emission spectroscopy (720-ES ICP-OES, Agilent, USA) with axial viewing and simultaneous CCD detection.

Sol immobilization (C2, C3, C4, C5, C6, C8, C11, C12)

A 2 wt.% solution of PVA was added to an aqueous HAuCl₄ solution (5.08·10⁻⁴ M) under vigorous stirring [PVA/Au (w/w) = 1.2]. A 0.1 M freshly prepared solution of NaBH₄ [NaBH₄/Au (mol/mol) = 5] was then added to

form a light-red (Au) metallic sol. After 30 min of sol generation, the colloid was immobilized by adding the support (MgO, CaO, TiO₂, CeO₂, ZrO₂, and Amberlyst) under vigorous stirring. The amount of support was calculated to give a total final metal loading of 2 wt.% (nominal). After 2 h, the slurry was filtered and the solid was washed with hot deionized water (2 x 25 mL) and ethanol (2 x 25 mL) before drying at 100 °C for 1 h. The final metal loading was determined by ICP analysis.

Wet impregnation (C9, C10)

Pt/SiO₂: appropriate quantities of Pt(NH₃)₄Cl₂ and Pt(NH₃)₄(OH)₂ (ratio 1:1) were dissolved in deionized water. Silica (Degussa; specific surface area, 203 m².g⁻¹) was then added and the pH of the reactant mixture was maintained at 8.9. The mixture was mixed for 1 h at room temperature, filtered, and washed with hot water to remove all the Cl⁻ ions. The solid was then dried at 105 °C for 2 h and reduced with pure hydrogen at 420 °C for 4 h (2 °C.min⁻¹ and 50 cm³.min⁻¹). The final Pt loading was 6.3 %, as determined by ICP analysis

Ru/HAP: an appropriate quantity of Ru(acac)₃ (acac, acetylacetonate; Sigma Aldrich <99 %) was mixed with HAP (1 g) in water (50 mL) for 1 h at RT. Next, the reactant mixture was evaporated on a rotary evaporator for 1 h. The obtained solid was calcined at 400 °C for 4 h (4 °C.min⁻¹) and the quantity of Ru was subsequently determined by ICP analysis.

Co-precipitation (C13, C14, C15)

Appropriate quantities of Au (HAuCl₄), Pt (Pt(NH₃)₄Cl₂), and Pd (PdCl₂) precursor solutions were added dropwise to water solutions of the support (1 g in 50 cm³ water) and the reactant mixtures were stirred at room temperature for 1 h. Next, a water solution of NaOH was added to reach pH 9. Finally, the solid was recovered by filtration, washed with water, and dried at 100 °C overnight. The solids were reduced with pure hydrogen at 300 °C for 4 h (2 °C.min⁻¹ and 50 cm³.min⁻¹).

Transaminase production

The transaminase from *Chromobacterium violaceum* (UniProt acc. num.: Q7NWX4), cloned in a pET-22b(+) plasmid and transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3), was provided as isolated colonies on LB broth supplemented with 100 µg.mL⁻¹ ampicillin on a petri dish by Professor Thierry Gefflaut, ICCF, Clermont-Ferrand, France. This enzyme was tagged with a 6-His tag at its N-terminal extremity. The original clone was created by Professor Veronique De Berardinis, Genoscope, Evry, France. A colony was picked and introduced in a 15-mL vial containing 5 mL sterile LB broth supplemented with 100 µg.mL⁻¹ ampicillin. It was then incubated overnight (16 h) at 37 °C with 200 rpm agitation. Exactly 3 mL of this pre-inoculum was then introduced in 150 mL fresh LB broth supplemented with 100 µg.mL⁻¹ ampicillin. The culture was incubated at 37 °C under 200 rpm agitation for 5 h and then supplemented with 0.5 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) to induce enzyme overexpression. The culture was maintained at 30 °C overnight (16 h) under 200 rpm agitation and then centrifuged at 4,000 g for 10 min. Next, the supernatant was removed, and the pellet was washed twice with sodium phosphate buffer (40 mL, pH 7.0, 10 mM). The sample was centrifuged at 4,000 g for 10 min after each washing step and the supernatant was discarded. The resulting pellet was then resuspended in lysis sodium phosphate buffer (5 mL, pH 7.0, 10 mM; 50 µM pyridoxal phosphate). The cells were exploded with a French Press (FP) at 2.4 bar and the lysate was subsequently centrifuged at 16,000 g for 2 min to remove the cellular debris. The supernatant was recovered and stored at -80 °C before lyophilization. The protein concentration of the CFE was assayed using the Bradford methodology and was determined as ~10 mg.mL⁻¹ protein for each enzyme production batch. Lyophilization, which was performed at room temperature under a pressure of 25 mBar, afforded a white powder.

Cv-TA/LDH enzymatic assay

All the assays were performed in triplicate. The reactions were implemented at 200-µL scale in a microtiter plate, using 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8) containing 2 mM substrate [(1a), (4a), or (2a)], 5 U.mL⁻¹ LDH, 0.5 mg.mL⁻¹ NADH, 0.1 mM PLP, 0.1 mg.mL⁻¹ Cv-TA CFE, and 10 mM L-alanine. The kinetics were followed by spectrophotometry at 340 nm and 30 °C for 20 min. As described in the international measurement system, 1 UI enzyme activity corresponded to 1 µmol substrate transformed per minute. The optical path of the microtiter plate, well filled with 200 µL deionized water, was estimated at 0.59 cm.

AFCA transamination with Cv-TA using (S)-MBA as the amino donor

A 1 mL reaction mixture sample containing 10 mM 4a, 100 mM sodium dihydrogen phosphate, 10 mM (S)-MBA, and 1 mM pyridoxal phosphate in ultra-pure water was adjusted to pH 8 using concentrated sodium hydroxide solution. Next, 1 mg.mL⁻¹ Cv-TA CFE was added to the mixture and incubated for 5 h at 25 °C. A 50-µL aliquot was collected after 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 h, and product formation was quantified by HPLC-DAD at 245 and 280 nm as described in the general procedures.

AFCA transamination with Cv-TA using IPA as the amino donor

A 1 mL reaction mixture sample containing 10 mM 4a, 100 mM sodium dihydrogen phosphate, 10 mM (or 1 M) IPA, and 1 mM pyridoxal phosphate in ultra-pure water was adjusted to pH 8 using concentrated sodium hydroxide solution. Next, 1 mg.mL⁻¹ Cv-TA CFE was added to the mixture and incubated for 5 h at 25 °C. A 50-µL aliquot was collected after 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 h, and product formation was quantified by HPLC-DAD at 245 and 280 nm as described in the general procedures.

Cv-TA thermoactivity

The Cv-TA thermostability was tested at 30 and 60 °C. The reactions were implemented at 1-mL scale, using a 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8) containing 4 mM of 4a, 1 mM PLP, 25 mM L-alanine, and 0.1 mg.mL⁻¹ Cv-TA CFE. The reactions were incubated on a dry bath at 30 and 60 °C and 20-µL aliquots were collected after 10, 20, 30, 60, and 90 min. Next, 20 µL of the 50 U.mL⁻¹ LDH + 0.5 mg.mL⁻¹ NADH and 160 µL of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8) were added to each aliquot after cool-down at room temperature. The NADH conversion was followed by spectrophotometry at 340 nm and 30 °C.

Protein loading evaluation on EziG™

EziG™ OPAL, CORAL, and AMBER (EnginZyme, Sweden) were used as immobilization carriers for Cv-TA. Six different ratios (w/w 1:1, 1:3, 1:6, 1:9, 1:12, and 1:15) were tested. The desired carrier mass was suspended in 1 mL 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8), containing 1 mg.mL⁻¹ Cv-TA CFE and 1 mM PLP. The mixtures were incubated for 1 h at 25 °C on a rotative agitator (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) at 22 rpm. The mixtures were then centrifuged at 16,000 g for 1 min and 15 µL of the supernatant was collected. The remaining protein concentration was measured using the Bradford assay at 595 nm and determined using a bovine serum albumin (BSA) calibration curve (0 to 1 mg.mL⁻¹; concentration step, 0.1 mg.mL⁻¹).

Enzyme loading incubation time optimization

EziG™ OPAL, CORAL, and AMBER (EnginZyme, Sweden) were used as immobilization carriers for Cv-TA. Exactly 3 mg of each support was suspended in 1 mL 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8), containing 1 mg.mL⁻¹ Cv-TA CFE and 1 mM PLP. The mixtures were incubated for 3 h at 25 °C on a rotative agitator (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) at 22 rpm. After 15, 30, 45, 60, 120, and 180 min the agitation was stopped and a 15 µL sample was collected from the aqueous phase. Each sample was kept in an ice bath before further analysis. The remaining protein concentration was measured using the Bradford assay at 595 nm and

determined using a BSA calibration curve (from 0 to 1 mg.mL⁻¹; concentration step, 0.1 mg.mL⁻¹).

Cv-TA@EziGTM activity measurement

EziGTM OPAL, CORAL, and AMBER (EnginZyme, Sweden) were tested as immobilization carriers for Cv-TA. Thus, 1.5 mg of each support was suspended in 1 mL 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8) containing 0.5 mg.mL⁻¹ Cv-TA CFE and 1 mM PLP. The mixtures were incubated for 1 h at 25 °C on a rotative agitator (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) at 22 rpm. The mixtures were then centrifuged at 16,000 g for 1 min and the supernatants were discarded. The beads (1 mL) were resuspended in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8) containing 0.1 mM PLP, 4 mM **4a**, and 25 mM *L*-alanine. The reaction mixtures were incubated for 90 min at 30 °C on a rotative agitator (Thermoscientific, USA) at 22 rpm. Next, 20- μ L aliquots were collected after 10, 20, 30, 60, and 90 min, to which 20 μ L of 50 U.mL⁻¹ LDH + 0.5 mg.mL⁻¹ NADH and 160 μ L of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8) were added after cooling to room temperature. The disappearance of NADH was followed by spectrophotometry at 340 nm and 30 °C.

General synthetic Cv-TA@EziGTM OPAL immobilization procedure

For the hybrid reactions, Cv-TA in CFE was immobilized on EziGTM OPAL (EnginZyme, Sweden). Thus, 3 mg EziGTM OPAL was suspended in 1 mL of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8) containing 1 mg.mL⁻¹ Cv-TA CFE and 1 mM PLP. The mixture was incubated for 1 h at 25 °C on a rotative agitator (Thermoscientific, USA) at 22 rpm. The mixture was then centrifuged at 16,000 g for 1 min and the resultant supernatant was discarded. Cv-TA@EziGTM OPAL beads were immediately used in the synthetic reaction to limit enzyme denaturation.

Recycling of Cv-TA@EziGTM OPAL

Cv-TA was immobilized using the general synthetic procedure. The resulting Cv-TA@EziGTM OPAL was then incubated in 1 mL of reaction mixture containing 10 mM **4a**, 100 mM sodium dihydrogen phosphate, 10 mM (*S*)- α -methylbenzylamine, and 1 mM pyridoxal phosphate in ultra-pure water. The mixture was incubated for 5 h at 25 °C on a rotative agitator (Tube Revolver, Thermoscientific, USA). Exactly 50 μ L samples were collected after 30, 60, 120, 180, 240, and 300 min of reaction time, and the product concentrations were measured by HPLC-DAD at 245 and 280 nm. Once the reaction was complete (complete conversion of the substrate), the mixture was centrifuged at 16,000 g for 1 min and the supernatant was discarded. After the first cycle, the Cv-TA@EziGTM OPAL was kept at 4 °C for 16 h. A fresh solution containing 10 mM **4a**, 100 mM sodium dihydrogen phosphate, 10 mM (*S*)- α -methylbenzylamine, and 1 mM pyridoxal phosphate in ultra-pure water was then added to the immobilized enzyme. Incubation was allowed to proceed over 24 h, as described previously, and the reaction products were quantified after 30, 60, 120, 180, 240, 300, and 1440 min. The mixture was then centrifuged at 16,000 g for 1 min and the supernatant was discarded. An identical reaction mixture was then added, as previously described, to the immobilized enzyme and the incubation was allowed to proceed over 72 h. The reaction products were finally quantified after 30, 60, 120, 180, 240, 300, and 4320 min.

Purification of the reaction products

All the amine products were purified on DOWEX 50WX8 100–200 mesh ion exchange resin with a ratio of 0.1 mmol product to 20 mL resin. The resin was first washed with ultra-pure water until a neutral pH was obtained. The reaction mixture was then directly deposited on the resin and washed with four volumes of ultra-pure water. Elution was initiated with 0.5 M ammonium solution in ultra-pure water until a basic pH was attained. The elution of the product was then completed with 1 M ammonium solution in ultra-pure water. The elution of the product, which was followed on TLC with 0.1 M ammonium solution in distilled water as

the eluent, was revealed, using ninhydrin, as a yellow-brown spot. All the product-containing fractions were pooled together and evaporated using a MiVac Quattro Concentrator (Sp Scientific, United Kingdom) under 25 mBar at 35 °C.

FDCA was also purified on DOWEX 50WX8 100–200 mesh ion exchange resin with a ratio of 0.1 mmol product to 20 mL resin. The resin was first washed with ultra-pure water until a neutral pH was obtained. The reaction mixture was then directly deposited on the resin and washed with four volumes of ultra-pure water. The FDCA could directly be recovered after 20 mL of washing volume. Its elution was followed on TLC with 0.1 M ammonium solution in distilled water as the eluent, and the product was revealed by using a UV-lamp at 254 nm. All the product-containing fractions were pooled together. To ensure the absence of salts, the FDCA-containing solution (10 mL) was first acidified to pH 1 using a few drops of concentrated HCl and extracted using three aliquots of 20 mL ethyl acetate. The organic phase was finally evaporated using a MiVac Quattro Concentrator (Sp Scientific, United Kingdom) under 25 mBar at 35 °C.

Synthesis of the reference products

5-Hydroxymethylfurfurylamine (HMFA, 1b)

A 10-mL reaction mixture sample containing 10 mM **1a**, 100 mM sodium dihydrogen phosphate, 10 mM (*S*)- α -methylbenzylamine, and 1 mM pyridoxal phosphate in ultra-pure water was adjusted at pH 8 using concentrated sodium hydroxide solution. Next, 10 mg lyophilized CFE was added and the reaction mixture was incubated for 4 h at 25 °C. The product formation was followed by ¹H NMR. After the reaction was complete, the product was obtained by purification on ion exchange resin as described in the general procedures (TLC: *R*_f = 0.79 / eluant: 0.1 M ammoniac in distilled water). After drying, the product was recovered with >99 % yield in the form of a yellowish-brown powder.

¹H NMR (D₂O, 300 MHz): 3.78 (2H, s, CH₂NH₂), 4.55 (2H, s, CH₂OH), 6.23 (1H, d), 6.35 (1H, d); ¹³C (DEPT 45, D₂O, 300 MHz): 37.43, 55.78, 106.79, 109.06; ¹³C (DEPT 135, D₂O, 300 MHz): 37.43, 55.78, 106.79, 109.06; HSQC (D₂O, 300 MHz): 3.78, 55.78 (CH₂OH); 4.55, 37.43 (CH₂NH₂); 6.23, 106.79; 6.35, 109.06 (NMR spectra in Figures SI 15–18).

5-Aminomethyl-2-furancarboxaldehyde (AMFA, 3b)

A 4-mL reaction mixture sample containing 10 mM **2a**, 100 mM sodium dihydrogen phosphate, 10 mM (*S*)- α -methylbenzylamine, and 1 mM pyridoxal phosphate in ultra-pure water was adjusted to pH 8 using concentrated sodium hydroxide solution. Next, 4 mg lyophilized Cv-TA CFE was added, and the reaction mixture was incubated for 2 h at 25 °C. The product formation process was followed by HPLC-DAD and ¹H NMR over 2 h. The product could not be purified on ion exchange resin (TLC: *R*_f = 0.94 / eluant: 0.1 M ammoniac in distilled water).

5-Aminomethyl-2-furancarboxylic acid (AMFC, 4b)

A 10-mL reaction mixture sample containing 10 mM **4a**, 100 mM sodium dihydrogen phosphate, 10 mM (*S*)- α -methylbenzylamine, and 1 mM pyridoxal phosphate in ultra-pure water was adjusted to pH 8 using concentrated sodium hydroxide solution. Next, 10 mg lyophilized CFE was added and the reaction mixture was incubated for 4 h at 25 °C. The product formation process was followed by ¹H NMR. After the reaction was complete, the product was obtained by purification on ion exchange resin as described in the general procedures (TLC: *R*_f = 0.85 / eluant: 0.1 M ammoniac in distilled water). After drying, the product was recovered in >99 % yield as a yellow powder.

¹H NMR (D₂O, 300 MHz): 4.29 (2H, s, CH₂NH₂), 6.64 (1H, d), 7.00 (1H, d); ¹³C (DEPT 45, D₂O, 300 MHz): 38.41, 115.46, 118.63; ¹³C (DEPT 135, D₂O, 300 MHz): 35.36, 112.52, 115.73; HSQC (D₂O, 300 MHz): 4.29,

38.41 (CH₂NH₂); 6.64, 115.46; 7.00, 118.63 (NMR spectra described in Figures SI 19–22).

Catalyst screening for 5-hydroxymethylfurfural (1a) oxidation

The oxidation of **1a** was performed in a 2-mL GC vial. Thus, 2 mg solid catalyst was added to 1 mL of a 10 mM **1a** solution in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8) in ultra-pure water. The vials were incubated at 60 °C in a stove and stirred using a rotative agitator (Tube Revolver, Thermoscientific, USA) at 22 rpm, with an angle of 45° compared to the rotation axis to maintain good homogeneity in the reaction mixtures comprising the solid heterogeneous catalysts. In total, 15 different catalysts were tested as described in Table 1. A blank reaction was performed without the addition of a catalyst. To follow the product formation process, a 50- μ L aliquot was collected after 24 h and analyzed by HPLC-DAD as described in the general procedures.

« One-pot/two-steps » reactions

The first one-pot/two-steps reaction was performed in a 20 mL vial. Exactly 20 mg of solid catalyst were added to 10 mL of a 10 mM **1a** solution in 100 mM aqueous sodium phosphate buffer at pH 8. The reaction mixture was incubated at 60 °C in a stove and stirred using a rotative agitator (Thermoscientific, USA) at 22 rpm. Aliquots (50 μ L) were collected after 0, 24, 40, 48, and 64 h and the formation of the oxidation products was confirmed by HPLC-DAD. The reaction mixture was cooled down to room temperature (25 °C) after 64 h and 10 mg of Cv-TA@EziGTM OPAL was then added to the solution together with 1 mL of 100 mM (S)- α -methylbenzylamine and 500 μ M solution in ultra-pure water at pH 8. The reaction mixture was incubated at room temperature (25 °C) for 4 h. The product formation was confirmed by HPLC-DAD, as described in the general procedure after the reaction was complete. The reaction mixture was also analyzed by ¹H NMR to validate the complete conversion of **4a** into **4b** (Figure SI 23). After a total of 68 h of reaction, the catalysts were removed by centrifugation (4,000 g, 1 min) and the reaction products were purified on ion exchange resin as described in the general procedures. The 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid was recovered as a yellowish powder, with a yield of 50 % (7.1 mg), and characterized by NMR (¹H, ¹³C, and HSQC) and HPLC. The FDCA was recovered as a white powder, with a final yield of 43 % (6.7 mg) and confirmed by ¹H NMR and HPLC. In parallel to the synthesis, a blank reaction was run under the same conditions but in the absence of the Pt/SiO₂ catalyst. The second step was initiated after 70 h oxidation at 60 °C. The absence of oxidation of **1a** was followed by HPLC-DAD after 0, 24, 40, 48, 64, and 70 h (Figure SI 24), as described above, and the complete conversion of **1a** into **1b** after 4 h of transamination at 25 °C was confirmed in the same way (Figure SI 25).

For the second one-pot/two-steps reaction, oxidation step conditions were identical, and aliquots (50 μ L) were collected after 0, 24, 40 and 48 h (Figure SI 26). Oxidation products formation was confirmed by HPLC-DAD. The reaction mixture was cooled down to room temperature (25 °C) after 48 h and the transamination step was performed under the same conditions as for the first one-pot/two-steps reaction. After 4 h incubation at 25 °C, the product formation was confirmed by HPLC-DAD as described in the general procedure. The reaction mixture was also analyzed by ¹H NMR to validate the complete conversion of **4a** into **4b** (Figure SI 27). The catalysts were removed as described before, and products were purified on ion exchange resin as described in the general procedures. After purification, **4b** and **5a** could be recovered with a final yield of 67 % (9.4 mg) and 20 % (3.1 mg) respectively. In parallel to this second reaction, the corresponding oxidation blank reaction was run under the same conditions but in the absence of the Pt/SiO₂ catalyst. The second step was initiated after 48 h oxidation at 60 °C. The absence of oxidation of **1a** was followed by HPLC-DAD after 0, 24, 40, 48 and 52 h (Figure SI 28), as described above, and the complete conversion of **1a** into **1b** after 4 h of transamination at 25 °C was confirmed in the same way (Figure SI 29).

For the third one-pot/two-steps reaction, oxidation step conditions were again identical to the two previous ones, and aliquots (50 μ L) were collected after 0, 24, 40 and 48 h (Figure SI 30). Oxidation products formation was confirmed by HPLC-DAD. The reaction mixture was cooled to room temperature (25 °C) after 48 h and the transamination step was performed under the same conditions, as for the first one-pot/two-steps reaction, with a 1M isopropylamine solution added instead of the 100 mM (S)- α -methylbenzylamine solution. After 4 h incubation at 25 °C, the product formation was confirmed by HPLC-DAD as described in the general procedure. The reaction mixture was also analyzed by ¹H NMR to validate the complete conversion of **4a** into **4b** (Figure SI 31). The catalysts were removed as described before, and products were purified on ion exchange resin as described in the general procedures. After purification, **4b** and **5a** could be recovered with a final yield of 57 % (8.1 mg) and 20 % (3.1 mg) respectively. In parallel to this third reaction, the corresponding oxidation blank reaction was run under the same conditions but in the absence of the Pt/SiO₂ catalyst. The second step was initiated after 48 h oxidation at 60 °C. The absence of oxidation of **1a** was followed by HPLC-DAD after 0, 24, 40, 48 and 52 h (Figure SI 32), as described above, and the complete conversion of **1a** into **1b** after 4 h of transamination at 25 °C was confirmed in the same way (Figure SI 33).

Acknowledgements

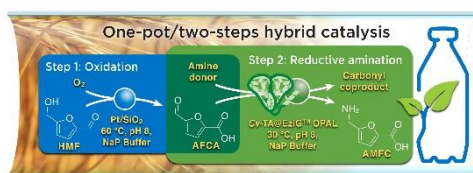
The authors would like to thank Prof. Thierry Gefflaut and Prof. Veronique De Beradinis for the Cv-TA expressing strain as well as Martine Sancelme for the protocol used for the enzyme overexpression. The authors would also like to acknowledge Dr. Till Bousquet and Celine Delabre for their help on the NMR structure determination of the amino products. The authors are grateful to Lenaick Herve for his participation in the production of the enzymes. They would also like to thank Dr. Svetlana Heyte, who handles the REALCAT platform where most of the experiments were performed. The HPLC-MS experiments were performed on the REALCAT platform funded by a French governmental subsidy managed by the French National Research Agency (ANR) within the frame of the "Future Investments" program (ANR-11- EQPX-0037). The Hauts-de-France region, FEDER, Ecole Centrale de Lille, and Centrale Initiatives Foundation are also warmly acknowledged for their financial contributions to the acquisition of REALCAT platform equipment. Finally, this study was supported by the French government through the Programme Investissement d'Avenir (I-SITE ULNE / ANR-16-IDEX-0004 ULNE) managed by the Agence Nationale de la Recherche.

Keywords: 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid • 5-hydroxymethylfurfural • biocatalysis • enzyme catalysis • heterogeneous catalysis • hybrid catalysis • platinum • transaminase

- [1] P. Anastas, J. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford, New York, **2000**.
- [2] a) S. Schmidt, K. Castiglione, R. Kourist, *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 1755–1768; b) N. Ríos-Lombardía, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *Catalysts* **2018**, *8*, 75; c) F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 12–22; d) R. Bisogno, M. G. López-Vidal, G. de Gonzalo, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 2026–2049; e) H. Gröger, in *Cooperative Catalysis* (Ed.: R. Peters), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2015**, pp. 325–350; f) H. Gröger, W. Hummel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171–179.

- [3] a) O. Långvik, T. Saloranta, D. Y. Murzin, R. Leino, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 4004–4015; b) C. A. Denard, H. Huang, M. J. Bartlett, L. Lu, Y. Tan, H. Zhao, J. F. Hartwig, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 465–469.
- [4] a) J. Zhao, B. R. Lichman, J. M. Ward, H. C. Hailes, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 1323–1326; b) M. J. Rodríguez-Álvarez, N. Ríos-Lombardía, S. Schumacher, D. Pérez-Iglesias, F. Morís, V. Cadierno, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 7753–7759; c) E. Liardo, N. Ríos-Lombardía, F. Morís, F. Rebollo, J. González-Sabín, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 4768–4774. d) R. C. Simon, E. Busto, J. H. Schrittwieser, J. H. Sattler, J. Pietruszka, K. Faber, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15669–15672.
- [5] a) A. Gimbernat, M. Guehl, N. Lopes Ferreira, E. Heuson, P. Dhulster, M. Capron, F. Dumeignil, D. Delcroix, J.-S. Girardon, R. Froidevaux, A. Gimbernat, M. Guehl, N. Lopes Ferreira, E. Heuson, P. Dhulster, M. Capron, F. Dumeignil, D. Delcroix, J.-S. Girardon, R. Froidevaux, *Catalysts* **2018**, *8*, 335; b) P. Schaaf, T. Bayer, M. Koley, M. Schnürch, U. T. Bornscheuer, F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 12978–12981; c) H. Sato, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 4488–4492; d) V. Gauchot, W. Kroutil, A. R. Schmitzer, *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16*, 6748–6751.
- [6] a) P. Zajkoska, M. Cárdenas-Fernández, G. J. Lye, M. Rosenberg, N. J. Turner, M. Rebroš, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2017**, *92*, 1558–1565; b) M. Sugiyama, Z. Hong, P.-H. Liang, S. M. Dean, L. J. Whalen, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 14811–14817.
- [7] F. Dumeignil, M. Guehl, A. Gimbernat, M. Capron, N. L. Ferreira, R. Froidevaux, J.-S. Girardon, R. Wojcieszak, P. Dhulster, D. Delcroix, *Catal. Sci. Technol.* **2018**, *8*, 5708–5734.
- [8] R. Schoevaart, T. Kieboom, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3399–3400.
- [9] M. Edin, J.-E. Bäckvall, A. Córdova, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7697–7701.
- [10] M. Makkee, A. P. G. Kieboom, H. V. Bekkum, J. A. Roels, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 930–931.
- [11] a) T. Xue, B. Peng, M. Xue, X. Zhong, C.-Y. Chiu, S. Yang, Y. Qu, L. Ruan, S. Jiang, S. Dubin, R. B. Kaner, J. I. Zink, M. E. Meyerhoff, X. Duan, Y. Huang, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3200; b) Z. J. Wang, K. N. Clary, R. G. Bergman, K. N. Raymond, F. D. Toste, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 100–103; c) M. Filice, M. Marciello, M. del Puerto Morales, J. M. Palomo, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 6876–6878; d) K. Kamwilaisak, P. C. Wright, *Energy Fuels* **2012**, *26*, 2400–2406.
- [12] B. H. Shanks, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 533–535.
- [13] a) S. Y. Lee, H. U. Kim, T. U. Chae, J. S. Cho, J. W. Kim, J. H. Shin, D. I. Kim, Y.-S. Ko, W. D. Jang, Y.-S. Jang, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 18–33; b) L. Wu, T. Moteki, A. A. Gokhale, D. W. Flaherty, F. D. Toste, *Chem* **2016**, *1*, 32–58; c) F. Dumeignil, M. Capron, B. Katryniok, R. Wojcieszak, A. Löfberg, J.-S. Girardon, S. Desset, M. Araque-Marin, L. Jalowiecki-Duhamel, S. Paul, *J. Jpn. Pet. Inst.* **2015**, *58*, 257–273; d) F. H. Isikgor, C. R. Becer, *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 4497–4559; e) M. Dusselier, M. Mascal, B. F. Sels, in *Selective Catalysis for Renewable Feedstocks and Chemicals* (Ed.: K.M. Nicholas), Springer International Publishing, **2014**, pp. 1–40.
- [14] R.-J. van Putten, J. C. van der Waal, E. de Jong, C. B. Rasrendra, H. J. Heeres, J. G. de Vries, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1499–1597.
- [15] a) S. Chen, R. Wojcieszak, F. Dumeignil, E. Marceau, S. Royer, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 11023–11117; b) R. Wojcieszak, C. Ferraz, J. Sha, S. Houda, L. Rossi, S. Paul, *Catalysts* **2017**, *7*, 352.
- [16] a) W. Fan, C. Verrier, Y. Queneau, F. Popowycz, *Curr. Org. Synth.* **2019**, *16*, 583–614; b) L. Hu, L. Lin, Z. Wu, S. Zhou, S. Liu, *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2017**, *74*, 230–257; c) A. A. Rosatella, S. P. Simeonov, R. F. M. Frade, C. A. M. Afonso, *Green Chem.* **2011**, *13*, 754.
- [17] L. Hu, A. He, X. Liu, J. Xia, J. Xu, S. Zhou, J. Xu, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6*, 15915–15935.
- [18] V. Froidevaux, C. Negrell, S. Caillol, J.-P. Pascault, B. Boutevin, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 14181–14224.
- [19] a) X. Chen, J. Wang, S. Huo, S. Yang, B. Zhang, H. Cai, *J. Therm. Anal. Calorim.* **2019**, *135*, 3153–3164; b) K. Krishnamoorthy, D. Subramani, N. Eeda, A. Muthukaruppan, *Polym. Adv. Technol.* **2019**, *30*, 1856–1864.
- [20] a) M. S. Holfinger, A. H. Conner, D. R. Holm, C. G. Hill, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1595–1598; b) J. L. Cawse, J. L. Stanford, R. H. Still, *Die Makromolekulare Chemie* **1984**, *185*, 697–707.
- [21] M. Chatterjee, T. Ishizaka, H. Kawanami, *Green Chem.* **2016**, *18*, 487–496.
- [22] G. Chieffi, M. Braun, D. Esposito, *ChemSusChem* **2015**, *8*, 3590–3594.
- [23] a) S. Jiang, C. Ma, E. Muller, M. Pera-Titus, F. Jérôme, K. De Oliveira Vigier, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 8893–8902; b) G. Hahn, P. Kunnas, N. de Jonge, R. Kempe, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 71–77; c) X. Wang, W. Chen, Z. Li, X. Zeng, X. Tang, Y. Sun, T. Lei, L. Lin, *J. Energy Chem.* **2018**, *27*, 209–214; d) D. Chandra, Y. Inoue, M. Sasase, M. Kitano, A. Bhaumik, K. Kamata, H. Hosono, M. Hara, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 5949–5956; e) F. Blume, M. Albeiruty, J. Deska, *Synthesis* **2015**, *47*, 2093–2099; f) Z. Xu, P. Yan, W. Xu, S. Jia, Z. Xia, B. Chung, Z. C. Zhang, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 59083–59087; g) M. A. Ayedi, Y. Le Bigot, H. Ammar, S. Abid, R. E. Gharbi, M. Delmas, *J. Soc. Chim. Tunis.* **2012**, 109–116.
- [24] A. Dumbabin, F. Subrizi, J. M. Ward, T. D. Sheppard, H. C. Hailes, *Green Chem.* **2017**, *19*, 397–404.
- [25] a) R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129–143; b) S. Mathew, H. Yun, *ACS Catalysis* **2012**, *2*, 993–1001; c) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42–51.
- [26] A. Petri, G. Masia, O. Piccolo, *Catal. Commun.* **2018**, *114*, 15–18.
- [27] a) T. K. Chakraborty, S. Tapadar, S. Kiran Kumar, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1317–1320; b) M. Sharma, P. Kumar, H. Singh, T. K. Chakraborty, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2006**, *764*, 109–115.
- [28] a) C. P. Ferraz, M. Zieliński, M. Pietrowski, S. Heyte, F. Dumeignil, L. M. Rossi, R. Wojcieszak, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6*, 16332–16340; b) F. Grasset, P. Rey, V. Bellière-Baca, M. Araque, S. Paul, F. Dumeignil, R. Wojcieszak, B. Katryniok, *Catal. Today* **2017**, *279*, 164–167; c) R. Wojcieszak, I. M. Cuccovia, M. A. Silva, L. M. Rossi, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2016**, *422*, 35–42; d) V. G. Baldivino-Medrano, G. Pollefeyt, V. Bliznuk, I. Van Driessche, E. M. Gaigneaux, P. Ruiz, R. Wojcieszak, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1157–1166.
- [29] M. D. Truppo, J. D. Rozzell, J. C. Moore, N. J. Turner, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 395–398.
- [30] K. E. Cassimjee, M. Kadow, Y. Wikmark, M. S. Humble, M. L. Rothstein, D. M. Rothstein, J.-E. Bäckvall, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9134–9137.
- [31] M. P. Thompson, S. R. Derrington, R. S. Heath, J. L. Porter, J. Mangas-Sanchez, P. N. Devine, M. D. Truppo, N. J. Turner, *Tetrahedron* **2019**, *75*, 327–334.

Entry for the Table of Contents



5-Hydroxymethylfurfural is one of the main building blocks that can be easily obtained from biomass. Among its many possible transformations, furfurylamines have been little explored, probably due to their difficult synthesis which generally requires difficult conditions. This study presents a hybrid catalytic system combining a metal nanoparticle and an enzyme to efficiently produce 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid under mild conditions.

5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid • 5-hydroxymethylfurfural • hybrid catalysis • platinum • transaminase

Références

- (1) Van Putten, R.-J.; van der Waal, J. C.; de Jong, E.; Rasrendra, C. B.; Heeres, H. J.; de Vries, J. G. Hydroxymethylfurfural, A Versatile Platform Chemical Made from Renewable Resources. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 1499–1597. <https://doi.org/10.1021/cr300182k>.
- (2) Dashtban, M.; Gilbert, A.; Fatehi, P. Recent Advancements in the Production of Hydroxymethylfurfural. *RSC Adv* **2014**, *4* (4), 2037–2050. <https://doi.org/10.1039/C3RA45396K>.
- (3) Sajid, M.; Zhao, X.; Liu, D. Production of 2,5-Furandicarboxylic Acid (FDCA) from 5-Hydroxymethylfurfural (HMF): Recent Progress Focusing on the Chemical-Catalytic Routes. *Green Chem.* **2018**, *20* (24), 5427–5453. <https://doi.org/10.1039/C8GC02680G>.
- (4) Dutta, S.; De, S.; Saha, B. A Brief Summary of the Synthesis of Polyester Building-Block Chemicals and Biofuels from 5-Hydroxymethylfurfural. *ChemPlusChem* **2012**, *77* (4), 259–272. <https://doi.org/10.1002/cplu.201100035>.
- (5) Liu, X.; Wang, R. Upgrading of Carbohydrates to the Biofuel Candidate 5-Ethoxymethylfurfural (EMF). *Int. J. Chem. Eng.* **2018**, *2018*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/2316939>.
- (6) Balakrishnan, M.; Sacia, E. R.; Bell, A. T. Etherification and Reductive Etherification of 5-(Hydroxymethyl) Furfural: 5-(Alkoxyethyl) Furfurals and 2,5-Bis (Alkoxyethyl)Furans as Potential Bio-Diesel Candidates. *Green Chem.* **2012**, *14* (6), 1626. <https://doi.org/10.1039/c2gc35102a>.
- (7) Gupta, K.; Rai, R. K.; Singh, S. K. Metal Catalysts for Efficient Transformation of Biomass-Derived HMF and Furfural to Value Added Chemicals: Recent Progress. *ChemCatChem.* **2018**, *10* (11), <https://doi.org/10.1002/cctc.201701754>.
- (8) Froidevaux, V.; Negrell, C.; Caillol, S.; Pascual, J.-P.; Boutevin, B. Biobased Amines: From Synthesis to Polymers; Present and Future. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (22), 14181–14224. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00486>.
- (9) Egon Heuson. Recherche de nouvelles transaminases pour la synthèse d'amines chirales. Chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF22659.tel-01912560
- (10) Anastas, P. T.; Warner, J. C. Green Chemistry: Theory and Practice; Oxford University Press: Oxford, 1998
- (11) Denard, C. A.; Hartwig, J. F.; Zhao, H. Multistep One-Pot Reactions Combining Biocatalysts and Chemical Catalysts for Asymmetric Synthesis. *ACS Catal.* **2013**, *3* (12), 2856–2864. <https://doi.org/10.1021/cs400633a>.
- (12) Heuson, E.; Dumeignil, F. The Various Levels of Integration of Chemo- and Bio-Catalysis towards Hybrid Catalysis. *Catal Sci Technol.* **2020**, *10* (19), 7082–7100. <https://doi.org/10.1039/D0CY00696C>

- (13) Schmidt, S.; Castiglione, K.; Kourist, R. Overcoming the Incompatibility Challenge in Chemoenzymatic and Multi-Catalytic Cascade Reactions. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24* (8), 1755–1768. <https://doi.org/10.1002/chem.201703353>.
- (14) Ríos-Lombardía, N.; García-Álvarez, J.; González-Sabín, J. One-Pot Combination of Metal- and Bio-Catalysis in Water for the Synthesis of Chiral Molecules. *Catalysts* **2018**, *8* (2), 75. <https://doi.org/10.3390/catal8020075>.
- (15) Rudroff, F.; Mihovilovic, M. D.; Gröger, H.; Snajdrova, R.; Iding, H.; Bornscheuer, U. T. Author Correction: Opportunities and Challenges for Combining Chemo- and Biocatalysis. *Nat. Catal.* **2018**, *1* (4), 306–306. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0042-4>.
- (16) Bisogno, F. R.; López-Vidal, M. G.; de Gonzalo, G. Organocatalysis and Biocatalysis Hand in Hand: Combining Catalysts in One-Pot Procedures. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359* (12), 2026–2049. <https://doi.org/10.1002/adsc.201700158>.
- (17) Gröger, H. Metals and Metal Complexes in Cooperative Catalysis with Enzymes within Organic-Synthetic One-Pot Processes. In *Cooperative Catalysis*; Peters, R., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2015; pp 325–350. <https://doi.org/10.1002/9783527681020.ch11>.
- (18) Gröger, H.; Hummel, W. Combining the ‘Two Worlds’ of Chemocatalysis and Biocatalysis towards Multi-Step One-Pot Processes in Aqueous Media. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.03.002>.
- (19) Denard, C. A.; Huang, H.; Bartlett, M. J.; Lu, L.; Tan, Y.; Zhao, H.; Hartwig, J. F. Cooperative Tandem Catalysis by an Organometallic Complex and a Metalloenzyme. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (2), 465–469. <https://doi.org/10.1002/anie.201305778>.
- (20) Långvik, O.; Saloranta, T.; Murzin, D. Y.; Leino, R. Heterogeneous Chemoenzymatic Catalyst Combinations for One-Pot Dynamic Kinetic Resolution Applications. *ChemCatChem* **2015**, *7* (24), 4004–4015. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500459>.
- (21) Sato, H.; Hummel, W.; Gröger, H. Cooperative Catalysis of Noncompatible Catalysts through Compartmentalization: Wacker Oxidation and Enzymatic Reduction in a One-Pot Process in Aqueous Media. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (15), 4488–4492. <https://doi.org/10.1002/anie.201409590>.
- (22) Runge, M. B.; Mwangi, M. T.; Miller, A. L.; Perring, M.; Bowden, N. B. Cascade Reactions Using LiAlH₄ and Grignard Reagents in the Presence of Water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (5), 935–939. <https://doi.org/10.1002/anie.200703002>.
- (23) Latham, J.; Henry, J.-M.; Sharif, H. H.; Menon, B. R. K.; Shepherd, S. A.; Greaney, M. F.; Micklefield, J. Integrated Catalysis Opens New Arylation Pathways via Regiodivergent Enzymatic C–H Activation. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (1), 11873. <https://doi.org/10.1038/ncomms11873>.
- (24) Mwangi, M. T.; Runge, M. B.; Hoak, K. M.; Schulz, M. D.; Bowden, N. B. A Materials Approach to Site-Isolation of Grubbs Catalysts from Incompatible Solvents and M-Chloroperoxybenzoic Acid. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (9), 6780–6788. [10.1002/chem.200800094](https://doi.org/10.1002/chem.200800094)
- (25) Wedde, S.; Rommelmann, P.; Scherkus, C.; Schmidt, S.; Bornscheuer, U. T.; Liese, A.; Gröger, H. An Alternative Approach towards Poly-ε-Caprolactone through a Chemoenzymatic Synthesis: Combined Hydrogenation, Bio-Oxidations and Polymerization without the Isolation of Intermediates. *Green Chem.* **2017**, *19* (5), 1286–1290. <https://doi.org/10.1039/C6GC02529C>.

- (26) Schaaf, P.; Bayer, T.; Koley, M.; Schnürch, M.; Bornscheuer, U. T.; Rudroff, F.; Mihovilovic, M. D. Biocompatible Metal-Assisted C–C Cross-Coupling Combined with Biocatalytic Chiral Reductions in a Concurrent Tandem Cascade. *Chem. Commun.* **2018**, 54 (92), 12978–12981. <https://doi.org/10.1039/C8CC05304A>.
- (27) Gimbernat, A.; Guehl, M.; Lopes Ferreira, N.; Heuson, E.; Dhulster, P.; Capron, M.; Dumeignil, F.; Delcroix, D.; Girardon, J.-S.; Froidevaux, R.; Gimbernat, A.; Guehl, M.; Lopes Ferreira, N.; Heuson, E.; Dhulster, P.; Capron, M.; Dumeignil, F.; Delcroix, D.; Girardon, J.-S.; Froidevaux, R. From a Sequential Chemo-Enzymatic Approach to a Continuous Process for HMF Production from Glucose. *Catalysts* **2018**, 8 (8), 335. <https://doi.org/10.3390/catal8080335>.
- (28) Pesci, L.; Baydar, M.; Glueck, S.; Faber, K.; Liese, A.; Kara, S. Development and Scaling-Up of the Fragrance Compound 4-Ethylguaiaicol Synthesis via a Two-Step Chemo-Enzymatic Reaction Sequence. *Org. Process Res. Dev.* **2017**, 21, (1), 85–93 <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00362>
- (29) Gauchot, V.; Kroutil, W.; Schmitzer, A. R. Highly Recyclable Chemo-/Biocatalyzed Cascade Reactions with Ionic Liquids: One-Pot Synthesis of Chiral Biaryl Alcohols. *Chem. - Eur. J.* **2010**, 16 (23), 6748–6751. <https://doi.org/10.1002/chem.201000302>.
- (30) Draffin, S. P.; Duggan, P. J.; Duggan, S. A. M. Highly Fructose Selective Transport Promoted by Boronic Acids Based on a Pentaerythritol Core. *Org. Lett.* **2001**, 3 (6), 917–920. <https://doi.org/10.1021/ol015560x>.
- (31) Sonoike, S.; Itakura, T.; Kitamura, M.; Aoki, S. One-pot Chemoenzymatic Synthesis of Chiral 1,3Diols Using an Enantioselective Aldol Reaction with Chiral Zn²⁺ Complex Catalysts and Enzymatic Reduction Using Oxidoreductases with Cofactor Regeneration. *Chem. Asian. J.* **2012**, 7, (1), 64–74. [10.1002/asia.201100584](https://doi.org/10.1002/asia.201100584).
- (32) Zhao, J.; Lichman, B. R.; Ward, J. M.; Hailes, H. C. One-Pot Chemoenzymatic Synthesis of Trolline and Tetrahydroisoquinoline Analogues. *Chem. Commun.* **2018**, 54 (11), 1323–1326. <https://doi.org/10.1039/C7CC08024G>.
- (33) Rodríguez-Álvarez, M. J.; Ríos-Lombardía, N.; Schumacher, S.; Pérez-Iglesias, D.; Morís, F.; Cadierno, V.; García-Álvarez, J.; González-Sabín, J. Combination of Metal-Catalyzed Cycloisomerizations and Biocatalysis in Aqueous Media: Asymmetric Construction of Chiral Alcohols, Lactones, and γ -Hydroxy-Carbonyl Compounds. *ACS Catal.* **2017**, 7 (11), 7753–7759. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b02183>.
- (34) Liardo, E.; Ríos-Lombardía, N.; Morís, F.; Rebolledo, F.; González-Sabín, J. Hybrid Organo- and Biocatalytic Process for the Asymmetric Transformation of Alcohols into Amines in Aqueous Medium. *ACS Catal.* **2017**, 7 (7), 4768–4774. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b01543>.
- (35) Simon, R. C.; Busto, E.; Schrittwieser, J. H.; Sattler, J. H.; Pietruszka, J.; Faber, K.; Kroutil, W. Stereoselective Synthesis of γ -Hydroxynorvaline through Combination of Organo- and Biocatalysis. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (99), 15669–15672. <https://doi.org/10.1039/C4CC06230B>.
- (36) Scalacci, N.; Black, G. W.; Mattedi, G.; Brown, N. L.; Turner, N. J.; Castagnolo, D. Unveiling the Biocatalytic Aromatizing Activity of Monoamino Oxidases MAO-N and 6-HDNO: Development of Chemoenzymatic Cascades for the Synthesis of Pyrroles. *ACS Catal.* **2017**, 2 (7), 1295–1300. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b03081>.

- (37) Risi, C.; Zhao, F.; Castagnolo, D. Chemo-Enzymatic Metathesis/Aromatization Cascades for the Synthesis of Furans: Disclosing the Aromatizing Activity of Laccase/TEMPO in Oxygen-Containing Heterocycles. *ACS Catal.* **2019**, *9* (8), 7264–7269. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b02452>.
- (38) Dander, J. E.; Giroud, M.; Racine S.; Darzi E. R.; Alvizo A.; Entwistle D.; Garg N. K. Chemoenzymatic Conversion of Amides to Enantioenriched Alcohols in Aqueous Medium. *Commun. Chem.* **2019**, *2* (9), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42004-019-0182-8>.
- (39) Burda, E.; Hummel, W.; Gröger, H. Modular Chemoenzymatic One-Pot Syntheses in Aqueous Media: Combination of a Palladium-Catalyzed Cross-Coupling with an Asymmetric Biotransformation. *Angew Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (49), 9551–4. [10.1002/anie.200801341](https://doi.org/10.1002/anie.200801341).
- (40) Paris, J.; Telzerow, A.; Ríos-Lombardía, N.; Steiner, K.; Schwab, H.; Morís, F.; Gröger, H.; González-Sabín, J. Enantioselective One-Pot Synthesis of Biaryl-Substituted Amines by Combining Palladium and Enzyme Catalysis in Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7* (5), 5486–5493. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06715>.
- (41) Sand, H.; Weberskirch, R. Chemoenzymatic One-Pot Reaction of Noncompatible Catalysts: Combining Enzymatic Ester Hydrolysis with Cu(I)/Bipyridine Catalyzed Oxidation in Aqueous Medium. *RSC Adv.* **2017**, *7* (53), 33614–33626. <https://doi.org/10.1039/C7RA05451C>.
- (42) Sand, H.; Weberskirch, R. Bipyridine-Functionalized Amphiphilic Block Copolymers as Support Materials for the Aerobic Oxidation of Primary Alcohols in Aqueous Media. *RSC Adv.* **2015**, *5* (48), 38235–38242. <https://doi.org/10.1039/C5RA05715A>.
- (43) Verzijl, G. K. M.; de Vries, J. G.; Broxterman, Q. B. Removal of the Acyl Donor Residue Allows the Use of Simple Alkyl Esters as Acyl Donors for the Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. *Tetrahedron. Asymmetry.* **2005**, *16* (9), 1603–1610. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.02.028>.
- (44) Mutti, F. G.; Orthaber, A.; Schrittwieser, J. H.; de Vries, J. G.; Pietschnig, R.; Kroutil, W. Simultaneous Iridium Catalysed Oxidation and Enzymatic Reduction Employing Orthogonal Reagents. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (4), 8046–8048. <https://doi.org/10.1039/C0CC02813D>.
- (45) Ríos-Lombardía, N.; Vidal, C.; Liardo, E.; Morís, F.; García, J. From a Sequential to a Concurrent Reaction in Aqueous Medium: Ruthenium-Catalyzed Allylic Alcohol Isomerization and Asymmetric Bioreduction. *Angew. Chem.* **2016**, *30* (5), 8833–8837. [10.1002/ange.201601840](https://doi.org/10.1002/ange.201601840)
- (46) Ríos-Lombardía, N.; Vidal, C.; Cocina, M.; Morís, F.; García-Álvarez, J.; González-Sabín, J. Chemoenzymatic One-Pot Synthesis in an Aqueous Medium: Combination of Metal-Catalysed Allylic Alcohol Isomerisation–Asymmetric Bioamination. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (54), 10937–10940. <https://doi.org/10.1039/C5CC03298A>.
- (47) Cortes-Clerget, M.; Akporji, N.; Zhou, J. Bridging the gap between transition metal- and bio-catalysis via aqueous micellar catalysis. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (9), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09751-4>
- (48) Köhler, V.; Wilson, Y.; Dürrenberger, M. Synthetic Cascades Are Enabled by Combining Biocatalysts with Artificial Metalloenzymes. *Nat. Chem.* **2012**, *7* (5), 93–99. <https://doi.org/10.1038/nchem.1498>.

- (49) Gallou, F.; Isley, N. A.; Ganic, A.; Onken, U.; Parmentier, M. Surfactant Technology Applied toward an Active Pharmaceutical Ingredient: More than a Simple Green Chemistry Advance. *Green Chem.* **2016**, *18* (7), 14-19. <https://doi.org/10.1039/C5GC02371H>
- (50) Xu, J.; Peng, Y.; Xu, W.; Yu, H.; Lin, X.; Wu, Q. Enantiocomplementary Decarboxylative Hydroxylation Combining Photocatalysis and Whole-Cell Biocatalysis in One-Pot Cascade Process. *Green Chem.* **2019**, *21* (6), 1907-1911. <https://doi.org/10.1039/C9GC00098D>.
- (51) Sirasani, G.; Tong, L.; Balskus, E. P. A Biocompatible Alkene Hydrogenation Merges Organic Synthesis with Microbial Metabolism. *Angew Chem Int Ed.* **2014**, *53* (5), 7785-7788. <https://doi.org/10.1002/anie.201403148>.
- (52) Wallace, S.; Balskus, E. P. Interfacing Microbial Styrene Production with a Biocompatible Cyclopropanation Reaction. *Angew Chem Int Ed* **2015**, *54* (5), 7106-7109. <https://doi.org/10.1002/anie.201502185>.
- (53) Foulkes, J. M.; Malone, K. J.; Coker, V. S.; Turner, N. J.; Lloyd, J. R. Engineering a Biometallic Whole Cell Catalyst for Enantioselective Deracemization Reactions. *ACS Catal.* **2011**, *1* (11), 1589-1594. <https://doi.org/10.1021/cs200400t>.
- (54) Zajkoska, P.; Cárdenas-Fernández, M.; Lye, G. J.; Rosenberg, M.; Turner, N. J.; Rebroš, M. Chemo-Biocatalytic One-Pot Two-Step Conversion of Cyclic Amine to Lactam Using Whole Cell Monoamine Oxidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2017**, *92* (7), 1558-1565. <https://doi.org/10.1002/jctb.5146>.
- (55) Sugiyama, M.; Hong, Z.; Liang, P.-H.; Dean, S. M.; Whalen, L. J.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H. D-Fructose-6-Phosphate Aldolase-Catalyzed One-Pot Synthesis of Iminocyclitols. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (47), 14811-14817. <https://doi.org/10.1021/ja073911i>.
- (56) Dumeignil, F.; Guehl, M.; Gimbernat, A.; Capron, M.; Ferreira, N. L.; Froidevaux, R.; Girardon, J.-S.; Wojcieszak, R.; Dhulster, P.; Delcroix, D. From Sequential Chemoenzymatic Synthesis to Integrated Hybrid Catalysis: Taking the Best of Both Worlds to Open up the Scope of Possibilities for a Sustainable Future. *Catal. Sci. Technol.* **2018**, *8* (22), 5708-5734. <https://doi.org/10.1039/C8CY01190G>.
- (57) Makkee, M.; Kieboom, A. P. G.; Bekkum, H. V.; Roels, J. A. Combined Action of Enzyme and Metal Catalyst, Applied to the Preparation of D-Mannitol. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, No. 19, 930-931. <https://doi.org/10.1039/C39800000930>.
- (58) Shanks, B. H. Unleashing Biocatalysis/Chemical Catalysis Synergies for Efficient Biomass Conversion. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2* (8), 533-535. <https://doi.org/10.1021/cb7001522>.
- (59) Xue, T.; Peng, B.; Xue, M.; Zhong, X.; Chiu, C.-Y.; Yang, S.; Qu, Y.; Ruan, L.; Jiang, S.; Dubin, S.; Kaner, R. B.; Zink, J. I.; Meyerhoff, M. E.; Duan, X.; Huang, Y. Integration of Molecular and Enzymatic Catalysts on Graphene for Biomimetic Generation of Antithrombotic Species. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3200. <https://doi.org/10.1038/ncomms4200>.
- (60) Wang, Z. J.; Clary, K. N.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N.; Toste, F. D. A Supramolecular Approach to Combining Enzymatic and Transition Metal Catalysis. *Nat. Chem.* **2013**, *5* (2), 100-103. <https://doi.org/10.1038/nchem.1531>.
- (61) Kamwilaisak, K.; Wright, P. C. Investigating Laccase and Titanium Dioxide for Lignin Degradation. *Energy Fuels* **2012**, *26* (4), 2400-2406. <https://doi.org/10.1021/ef3000533>.

- (62) Heuson, E.; Froidevaux, R.; Itabaiana, I.; Wojcieszak, R.; Capron, M.; Dumeignil, F. Optimisation of Catalysts Coupling in Multi-Catalytic Hybrid Materials: Perspectives for the next Revolution in Catalysis. *Green Chem.* **2021**, *23* (5), 1942–1954. <https://doi.org/10.1039/D0GC04172F>.
- (63) Li, X.; Cao, Y.; Luo, K. Highly active enzyme–metal nanohybrids synthesized in protein–polymer conjugates. *Nat Catal* 2019 *2* (8), 718–725. <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0305-8>
- (64) Filice, M.; Marciello, M.; del Puerto Morales, M.; Palomo, J. M. Synthesis of Heterogeneous Enzyme–Metal Nanoparticle Biohybrids in Aqueous Media and Their Applications in C–C Bond Formation and Tandem Catalysis. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (61), 6876–6878. <https://doi.org/10.1039/C3CC42475H>.
- (65) Wang, Y.; Zhang, N.; Hübner, R.; Tan, D.; Löffler, M.; Facsko, S.; Zhang, E.; Ge, Y.; Qi, Z.; Wu, C. Enzymes Immobilized on Carbon Nitride (C₃N₄) Cooperating with Metal Nanoparticles for Cascade Catalysis. *Adv. Mater. Interfaces* **2019**, *6* (6), 1801664. <https://doi.org/10.1002/admi.201801664>.
- (66) Zhang, X.; Jing, L.; Chang, F.; Chen, S.; Yang, H.; Yang, Q. Positional Immobilization of Pd Nanoparticles and Enzymes in Hierarchical Yolk–Shell@shell Nanoreactors for Tandem Catalysis. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (55), 7780–7783. <https://doi.org/10.1039/C7CC03177G>.
- (67) Zhang, N.; Hübner, R.; Wang, Y.; Zhang, E.; Zhou, Y.; Dong, S.; Wu, C. Surface-Functionalized Mesoporous Nanoparticles as Heterogeneous Supports To Transfer Bifunctional Catalysts into Organic Solvents for Tandem Catalysis. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1* (11), 6378–6386. <https://doi.org/10.1021/acsanm.8b01572>.
- (68) Magadam, D. B.; Yadav, G. D. Design of Tandem Catalyst by Co-Immobilization of Metal and Enzyme on Mesoporous Foam for Cascaded Synthesis of (R)-Phenyl Ethyl Acetate. *Biochem. Eng. J.* **2018**, *129*, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.10.011>.
- (69) Wang, Y.; Zhang, N.; Zhang, E.; Han, Y.; Qi, Z.; Ansorge-Schumacher, M. B.; Ge, Y.; Wu, C. Heterogeneous Metal–Organic–Framework–Based Biohybrid Catalysts for Cascade Reactions in Organic Solvent. *Chem. - Eur. J.* **2019**, *25* (7), 1716–1721. <https://doi.org/10.1002/chem.201805680>.
- (70) Dutta, S.; Kumari, N.; Dubbu, S.; Woo, S.; Kumar, A.; Ohtsu, H.; Kim, J.; Cho, S. H.; Lee, I. S. Highly Mesoporous Metal Organic Frameworks as Synergistic Multimodal Catalytic Platforms for Divergent Cascade Reactions. *Angew. Chem.* 2020, *132* (8), 3444–3450. <https://doi.org/10.1002/ange.201916578>
- (71) Görbe, T.; Gustafson, K.; Verho, O.; Kervefors, G.; Zheng, H.; Zou, X.; Johnston, E. V.; Bäckvall, J.-E. Design of a Pd(0)-CalB CLEA Biohybrid Catalyst and Its Application in a One-Pot Cascade Reaction. *ACS Catal.* 2017, *3* (7) 1601–1605. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b03481>.
- (72) Engström, K.; Johnston, E. V.; Verho, O.; Gustafson, K. P. J.; Shakeri, M.; Tai, C.-W.; Bäckvall, J.-E. Co-Immobilization of an Enzyme and a Metal into the Compartments of Mesoporous Silica for Cooperative Tandem Catalysis: An Artificial Metalloenzyme. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (52), 14006–14010. <https://doi.org/10.1002/anie.201306487>.
- (73) Moradi, S.; Shokri, Z.; Ghorashi, N.; Navaee, A.; Rostami, A. Design and Synthesis of a Versatile Cooperative Catalytic Aerobic Oxidation System with Co-Immobilization of Palladium Nanoparticles and Laccase into the Cavities of MCF. *J. Catal.* **2020**, *382* (15), 305–319. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2019.12.023>.

- (74) Gao, S.; Wang, Z.; Ma, L.; Liu, Y.; Gao, J.; Jiang, Y. Mesoporous Core–Shell Nanostructures Bridging Metal and Biocatalyst for Highly Efficient Cascade Reactions. *ACS Catal.* **2020**, *10* (2), 1375–1380. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b04877>.
- (75) Ganai, A. Kr.; Shinde, P.; Dhar, B. B.; Sen Gupta, S.; Prasad, B. L. V. Development of a Multifunctional Catalyst for a “Relay” Reaction. *RSC Adv.* **2013**, *3* (7), 2186. <https://doi.org/10.1039/c2ra22829g>.
- (76) Smeets, V.; Baaziz, W.; Ersen, O.; Gaigneaux, E. M.; Boissière, C.; Sanchez, C.; Debecker, D. P. Hollow Zeolite Microspheres as a Nest for Enzymes: A New Route to Hybrid Heterogeneous Catalysts. *Chem. Sci.*, **2020**, *11* (9), 954–961. <https://doi.org/10.1039/C9SC04615A>
- (77) Rosatella, A. A.; Simeonov, S. P.; Frade, R. F. M.; Afonso, C. A. M. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) as a Building Block Platform: Biological Properties, Synthesis and Synthetic Applications. *Green Chem.* **2011**, *13* (4), 754. <https://doi.org/10.1039/c0gc00401d>.
- (78) Lee, S. Y.; Kim, H. U.; Chae, T. U.; Cho, J. S.; Kim, J. W.; Shin, J. H.; Kim, D. I.; Ko, Y.-S.; Jang, W. D.; Jang, Y.-S. A Comprehensive Metabolic Map for Production of Bio-Based Chemicals. *Nat. Catal.* **2019**, *2* (1), 18–33. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0212-4>.
- (79) Wu, L.; Moteki, T.; Gokhale, A. A.; Flaherty, D. W.; Toste, F. D. Production of Fuels and Chemicals from Biomass: Condensation Reactions and Beyond. *Chem* **2016**, *1* (1), 32–58. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2016.05.002>.
- (80) Dumeignil, F.; Capron, M.; Katryniok, B.; Wojcieszak, R.; Löfberg, A.; Girardon, J.-S.; Desset, S.; Araque-Marin, M.; Jalowiecki-Duhamel, L.; Paul, S. Biomass-Derived Platform Molecules Upgrading through Catalytic Processes: Yielding Chemicals and Fuels. *J. Jpn. Pet. Inst.* **2015**, *58* (5), 257–273. <https://doi.org/10.1627/jpi.58.257>.
- (81) Isikgor, F. H.; Becer, C. R. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for the Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (25), 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>.
- (82) Dusselier, M.; Mascal, M.; Sels, B. F. Top Chemical Opportunities from Carbohydrate Biomass: A Chemist’s View of the Biorefinery. In *Selective Catalysis for Renewable Feedstocks and Chemicals*; 2014; pp 1–40. https://doi.org/10.1007/128_2014_544.
- (83) Chatterjee, M.; Ishizaka, T.; Kawanami, H. Reductive Amination of Furfural to Furfurylamine Using Aqueous Ammonia Solution and Molecular Hydrogen: An Environmentally Friendly Approach. *Green Chem.* **2016**, *18* (2), 487–496. <https://doi.org/10.1039/C5GC01352F>.
- (84) Chieffi, G.; Braun, M.; Esposito, D. Continuous Reductive Amination of Biomass-Derived Molecules over Carbonized Filter Paper-Supported FeNi Alloy. *ChemSusChem* **2015**, *8* (21), 3590–3594. <https://doi.org/10.1002/cssc.201500804>.
- (85) Jiang, S.; Ma, C.; Muller, E.; Pera-Titus, M.; Jérôme, F.; De Oliveira Vigier, K. Selective Synthesis of THF-Derived Amines from Biomass-Derived Carbonyl Compounds. *ACS Catal.* **2019**, *9* (10), 8893–8902. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b03413>.
- (86) Hahn, G.; Kunnas, P.; de Jonge, N.; Kempe, R. General Synthesis of Primary Amines via Reductive Amination Employing a Reusable Nickel Catalyst. *Nat. Catal.* **2019**, *2* (1), 71–77. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0202-6>.

- (87) Wang, X.; Chen, W.; Li, Z.; Zeng, X.; Tang, X.; Sun, Y.; Lei, T.; Lin, L. Synthesis of Bis(Amino)Furans from Biomass Based 5-Hydroxymethyl Furfural. *J. Energy Chem.* **2018**, *27* (1), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2017.06.015>.
- (88) Chandra, D.; Inoue, Y.; Sasase, M.; Kitano, M.; Bhaumik, A.; Kamata, K.; Hosono, H.; Hara, M. A High Performance Catalyst of Shape-Specific Ruthenium Nanoparticles for Production of Primary Amines by Reductive Amination of Carbonyl Compounds. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (27), 5949–5956. <https://doi.org/10.1039/C8SC01197D>.
- (89) Xu, Z.; Yan, P.; Xu, W.; Jia, S.; Xia, Z.; Chung, B.; Zhang, Z. C. Direct Reductive Amination of 5-Hydroxymethylfurfural with Primary/Secondary Amines via Ru-Complex Catalyzed Hydrogenation. *RSC Adv.* **2014**, *4* (103), 59083–59087. <https://doi.org/10.1039/C4RA10349A>.
- (90) Ayedi, M. A.; Le Bigot, Y.; Ammar, H.; Abid, S.; Gharbi, R. E.; Delmas, M. Simple, Novel Synthesis of Furfurylamine from Furfural by One-Pot Reductive Amination in Water Using Zinc Metal. *J. Société Chim. Tunis.* **2012**, *14* (8), 109–116.
- (91) Hu, L.; He, A.; Liu, X.; Xia, J.; Xu, J.; Zhou, S.; Xu, J. Biocatalytic Transformation of 5-Hydroxymethylfurfural into High-Value Derivatives: Recent Advances and Future Aspects. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (12), 15915–15935. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04356>.
- (92) Dunbabin, A.; Subrizi, F.; Ward, J. M.; Sheppard, T. D.; Hailes, H. C. Furfurylamines from Biomass: Transaminase Catalysed Upgrading of Furfurals. *Green Chem.* **2017**, *19* (2), 397–404. <https://doi.org/10.1039/C6GC02241C>.
- (93) Erythropel, H. C.; Zimmerman, J. B.; de Winter, T. M.; Petitjean, L.; Melnikov, F.; Lam, C. H.; Lounsbury, A. W.; Mellor, K. E.; Janković, N. Z.; Tu, Q.; Pincus, L. N.; Falinski, M. M.; Shi, W.; Coish, P.; Plata, D. L.; Anastas, P. T. The Green ChemisTREE: 20 Years after Taking Root with the 12 Principles. *Green Chem.* **2018**, *20* (9), 1929–1961. <https://doi.org/10.1039/C8GC00482J>.
- (94) Rigo, D.; Polidoro, D.; Perosa, A.; Selva, M. Diversified Upgrading of HMF via Acetylation, Aldol Condensation, Carboxymethylation, Vinylation and Reductive Amination Reactions. *Mol. Catal.* **2021**, *514*, 111838. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2021.111838>.
- (95) Karve, V. V.; Sun, D. T.; Trukhina, O.; Yang, S.; Oveisi, E.; Luterbacher, J.; Queen, W. L. Efficient Reductive Amination of HMF with Well Dispersed Pd Nanoparticles Immobilized in a Porous MOF/Polymer Composite. *Green Chem.* **2020**, *22* (2), 368–378. <https://doi.org/10.1039/C9GC03140E>.
- (96) Roylance, J. J.; Choi, K.-S. Electrochemical Reductive Amination of Furfural-Based Biomass Intermediates. *Green Chem.* **2016**, *18* (20), 5412–5417. <https://doi.org/10.1039/C6GC01541G>.
- (97) Nishimura, S.; Mizuhori, K.; Ebitani, K. Reductive Amination of Furfural toward Furfurylamine with Aqueous Ammonia under Hydrogen over Ru-Supported Catalyst. *Res. Chem. Intermed.* **2016**, *42* (1), 19–30. <https://doi.org/10.1007/s11164-015-2334-5>.
- (98) Zhou, K.; Chen, B.; Zhou, X.; Kang, S.; Xu, Y.; Wei, J. Selective Synthesis of Furfurylamine by Reductive Amination of Furfural over Raney Cobalt. *ChemCatChem* **2019**, *11* (22), 5562–5569. <https://doi.org/10.1002/cctc.201901269>.
- (99) Dong, C.; Wang, H.; Du, H.; Peng, J.; Cai, Y.; Guo, S.; Zhang, J.; Samart, C.; Ding, M. Ru/HZSM-5 as an Efficient and Recyclable Catalyst for Reductive Amination of Furfural to Furfurylamine. *Mol. Catal.* **2020**, *482*, 110755. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110755>.

- (100) Chen, W.; Sun, Y.; Du, J.; Si, Z.; Tang, X.; Zeng, X.; Lin, L.; Liu, S.; Lei, T. Preparation of 5-(Aminomethyl)-2-Furanmethanol by Direct Reductive Amination of 5-Hydroxymethylfurfural with Aqueous Ammonia over the Ni/SBA-15 Catalyst: Preparation of 5-(Aminomethyl)-2-Furanmethanol by Direct Reductive Amination. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2018**, *93* (10), 3028–3034. <https://doi.org/10.1002/jctb.5661>.
- (101) García-Ortiz, A.; Vidal, J. D.; Climent, M. J.; Concepción, P.; Corma, A.; Iborra, S. Chemicals from Biomass: Selective Synthesis of N-Substituted Furfuryl Amines by the One-Pot Direct Reductive Amination of Furanic Aldehydes. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7* (6), 6243–6250. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06631>.
- (102) Behling, R.; Valange, S.; Chatel, G. Heterogeneous Catalytic Oxidation for Lignin Valorization into Valuable Chemicals: What Results? What Limitations? What Trends? *Green Chem.* **2016**, *18* (7), 1839–1854. <https://doi.org/10.1039/C5GC03061G>.
- (103) Nisha S; Arun karthick; Gobi. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme.
- (104) Lilly, M. D.; Woodley, J. M. A Structured Approach to Design and Operation of Biotransformation Processes. *J. Ind. Microbiol.* **1996**, *17* (1), 24–29. <https://doi.org/10.1007/BF01570144>.
- (105) Bettati, A. M. and S. Exploring the pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes | Kopernio
- (106) David Rozzell, J. Immobilized Aminotransferases for Amino Acid Production. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, **1987**, 136, 479–497. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(87\)36046-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(87)36046-X).
- (107) Needham, D. A quantitative study of succinic acid in muscle. *Biochem J.* **1930**, *24* (1), 208–227. [10.1042/bj0240208](https://doi.org/10.1042/bj0240208)
- (108) Kelly, S. A.; Pohle, S.; Wharry, S.; Mix, S.; Allen, C. C. R.; Moody, T. S.; Gilmore, B. F. Application of ω -Transaminases in the Pharmaceutical Industry. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (1), 349–367. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00437>.
- (109) Koszelewski, D.; Tauber, K.; Faber, K.; Kroutil, W. ω -Transaminases for the Synthesis of Non-Racemic α -Chiral Primary Amines. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28* (6), 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.03.003>.
- (110) Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. Enzyme Immobilization by Adsorption: A Review. *Adsorption* **2014**, *20* (5–6), 801–821. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>.
- (111) Mohamad, N. R.; Marzuki, N. H. C.; Buang, N. A.; Huyop, F.; Wahab, R. A. An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for Immobilized Enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29* (2), 205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.
- (112) Vinke, P.; van Dam, H. E.; van Bekkum, H. Platinum Catalyzed Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural. In *Studies in Surface Science and Catalysis*; Elsevier, 1990; Vol. 55, pp 147–158. [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(08\)60144-5](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(08)60144-5).
- (113) Qin, Y.-Z.; Li, Y.-M.; Zong, M.-H.; Wu, H.; Li, N. Enzyme-Catalyzed Selective Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) and Separation of HMF and 2,5-Diformylfuran Using Deep Eutectic Solvents. *Green Chem.* **2015**, *17* (7), 3718–3722. <https://doi.org/10.1039/C5GC00788G>.

- (114) Carro, J.; Ferreira, P.; Rodríguez, L.; Prieto, A.; Serrano, A.; Balcells, B.; Ardá, A.; Jiménez-Barbero, J.; Gutiérrez, A.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.; Martínez, A. T. 5-Hydroxymethylfurfural Conversion by Fungal Aryl-alcohol Oxidase and Unspecific Peroxygenase. *FEBS J.* **2015**, *282* (16), 3218–3229. <https://doi.org/10.1111/febs.13177>.
- (115) Jia, H.-Y.; Zong, M.-H.; Zheng, G.-W.; Li, N. One-Pot Enzyme Cascade for Controlled Synthesis of Furancarboxylic Acids from 5-Hydroxymethylfurfural by H₂O₂ Internal Recycling. *ChemSusChem*. 2019 (21) :4764-4768. **10.1002/cssc.20190219**
- (116) Zhang, C. Highly Efficient and Selective Production of FFCA from CotA-TJ102 Laccase-Catalyzed Oxidation of 5-HMF. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *128* (8), 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.104>
- (117) Verdeguer, P.; Merat, N.; Gaset, A. Oxydation catalytique du HMF en acide 2,5-furane dicarboxylique. *J. Mol. Catal.* **1993**, *85* (3), 327–344. [https://doi.org/10.1016/0304-5102\(93\)80059-4](https://doi.org/10.1016/0304-5102(93)80059-4).
- (118) Gorbanev, Y. Y.; Klitgaard, S. K.; Woodley, J. M.; Christensen, C. H.; Riisager, A. Gold-Catalyzed Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural in Water at Ambient Temperature. *ChemSusChem* **2009**, *2* (7), 672–675. <https://doi.org/10.1002/cssc.200900059>.
- (119) Casanova, O.; Iborra, S.; Corma, A. Biomass into Chemicals: Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethyl-2-furfural into 2,5-Furandicarboxylic Acid with Gold Nanoparticle Catalysts. *ChemSusChem*. 2009, *2* (12) :1138-44. **10.1002/cssc.200900137**.
- (120) Gupta, N. K.; Nishimura, S.; Takagaki, A.; Ebitani, K. Hydrotalcite-Supported Gold-Nanoparticle-Catalyzed Highly Efficient Base-Free Aqueous Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural into 2,5-Furandicarboxylic Acid under Atmospheric Oxygen Pressure. *Green Chem.* **2011**, *13* (4), 824. <https://doi.org/10.1039/c0gc00911c>.
- (121) Ardemani, L.; Cibin, G.; Dent, A. J.; Isaacs, M. A.; Kyriakou, G.; Lee, A. F.; Parlett, C. M. A.; Parry, S. A.; Wilson, K. Solid Base Catalysed 5-HMF Oxidation to 2,5-FDCA over Au/Hydrotalcites: Fact or Fiction? *Chem. Sci.* **2015**, *6* (8), 4940–4945. <https://doi.org/10.1039/C5SC00854A>.
- (122) Rass, H. A.; Essayem, N. Selective Aerobic Oxidation of 5-HMF into 2,5-Furandicarboxylic Acid with Pt Catalysts Supported on TiO₂- and ZrO₂-Based Supports. *ChemsusChem*, 2015, *8* (12), 1206-1217. <https://doi.org/10.1002/cssc.201403390>
- (123) Ait Rass, H.; Essayem, N.; Besson, M. Selective Aqueous Phase Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to 2,5-Furandicarboxylic Acid over Pt/C Catalysts: Influence of the Base and Effect of Bismuth Promotion. *Green Chem.* **2013**, *15* (8), 2240. <https://doi.org/10.1039/c3gc40727f>.
- (124) da Silva, E. D.; Gonzalez, W. A.; Fraga, M. A. Aqueous-Phase Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural over Pt/ZrO₂ Catalysts: Exploiting the Alkalinity of the Reaction Medium and Catalyst Basicity. *Green Process. Synth.* **2016**, *5* (4). <https://doi.org/10.1515/gps-2016-0010>.
- (125) Niu, W.; Wang, D.; Yang, G.; Sun, J.; Wu, M.; Yoneyama, Y.; Tsubaki, N. Pt Nanoparticles Loaded on Reduced Graphene Oxide as an Effective Catalyst for the Direct Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) to Produce 2,5-Furandicarboxylic Acid (FDCA) under Mild Conditions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2014**, *87* (10), 1124–1129. <https://doi.org/10.1246/bcsj.20140096>.

- (126) Zhou, C.; Deng, W.; Wan, X.; Zhang, Q.; Yang, Y.; Wang, Y. Functionalized Carbon Nanotubes for Biomass Conversion: The Base-Free Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to 2,5-Furandicarboxylic Acid over Platinum Supported on a Carbon Nanotube Catalyst. *ChemCatChem* **2015**, *7* (18), 2853–2863. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500352>.
- (127) Miao, Z.; Wu, T.; Li, J.; Yi, T.; Zhang, Y.; Yang, X. Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) Effectively Catalyzed by a Ce_{0.8}Bi_{0.2}O_{2-δ} Supported Pt Catalyst at Room Temperature. *RSC Adv.* **2015**, *5* (26), 19823–19829. <https://doi.org/10.1039/C4RA16968A>.
- (128) Siankevich, S.; Savoglidis, G.; Fei, Z.; Laurency, G.; Alexander, D. T. L.; Yan, N.; Dyson, P. J. A Novel Platinum Nanocatalyst for the Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural into 2,5-Furandicarboxylic Acid under Mild Conditions. *J. Catal.* **2014**, *315*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2014.04.011>.
- (129) Siyo, B.; Schneider, M.; Radnik, J.; Pohl, M.-M.; Langer, P.; Steinfeldt, N. Influence of Support on the Aerobic Oxidation of HMF into FDCA over Preformed Pd Nanoparticle Based Materials. *Appl. Catal. Gen.* **2014**, *478*, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2014.03.020>.
- (130) Siyo, B.; Schneider, M.; Pohl, M.-M.; Langer, P.; Steinfeldt, N. Synthesis, Characterization, and Application of PVP-Pd NP in the Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). *Catal. Lett.* **2014**, *144* (3), 498–506. <https://doi.org/10.1007/s10562-013-1186-0>.
- (131) Mei, N.; Liu, B.; Zheng, J.; Lv, K.; Tang, D.; Zhang, Z. A Novel Magnetic Palladium Catalyst for the Mild Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural Into 2,5-furandicarboxylic acid in water. *Catal Sci Technol* **2015**, *9* (5), 3194–3202. <https://doi.org/10.1039/C4CY01407C>
- (132) Zhang, Z.; Zhen, J.; Liu, B.; Lv, K.; Deng, K. Selective Aerobic Oxidation of the Biomass-Derived Precursor 5-Hydroxymethylfurfural to 2,5-Furandicarboxylic Acid under Mild Conditions over a Magnetic Palladium Nanocatalyst. *Green Chem.* **2015**, *17* (2), 1308–1317. <https://doi.org/10.1039/C4GC01833H>.
- (133) Pasini, T.; Piccinini, M.; Blosi, M.; Bonelli, R.; Albonetti, S.; Dimitratos, N.; Lopez-Sanchez, J. A.; Sankar, M.; He, Q.; Kiely, C. J.; Hutchings, G. J.; Cavani, F. Selective Oxidation of 5-Hydroxymethyl-2-Furfural Using Supported Gold–Copper Nanoparticles. *Green Chem.* **2011**, *13* (8), 2091. <https://doi.org/10.1039/c1gc15355b>.
- (134) Albonetti, S.; Pasini, T.; Lolli, A.; Blosi, M.; Piccinini, M.; Dimitratos, N.; Lopez-Sanchez, J. A.; Morgan, D. J.; Carley, A. F.; Hutchings, G. J.; Cavani, F. Selective Oxidation of 5-Hydroxymethyl-2-Furfural over TiO₂-Supported Gold–Copper Catalysts Prepared from Preformed Nanoparticles: Effect of Au/Cu Ratio. *Catal. Today* **2012**, *195* (1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2012.05.039>.
- (135) Nie, J.; Xie, J.; Liu, H. Efficient Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to 2,5-Diformylfuran on Supported Ru Catalysts. *J. Catal.* **2013**, *301* (9), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2013.01.007>.
- (136) Chadderdon, D. J.; Xin, L.; Qi, J.; Qiu, Y.; Krishna, P.; More, K. L.; Li, W. Electrocatalytic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to 2,5-Furandicarboxylic Acid on Supported Au and Pd Bimetallic Nanoparticles. *Green Chem.* **2014**, *16* (9), 3778–3786. <https://doi.org/10.1039/C4GC00401A>.
- (137) Gui, Z.; Cao, W.; Saravanamurugan, S.; Riisager, A.; Chen, L.; Qi, Z. Efficient Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural in Aqueous Media with Au-Pd Supported on Zinc Hydroxycarbonate. *ChemCatChem* **2016**, *8* (23), 3636–3643. <https://doi.org/10.1002/cctc.201600852>.

- (138) Vuyyuru, K. R.; Strasser, P. Oxidation of Biomass Derived 5-Hydroxymethylfurfural Using Heterogeneous and Electrochemical Catalysis. *Catal. Today* **2012**, *195* (1), 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2012.05.008>.
- (139) Yi, G.; Teong, S. P.; Zhang, Y. Base-Free Conversion of 5-Hydroxymethylfurfural to 2,5-Furandicarboxylic Acid over a Ru/C Catalyst. *Green Chem.* **2016**, *18* (4), 979–983. <https://doi.org/10.1039/C5GC01584G>.
- (140) Mishra, D. K.; Lee, H. J.; Kim, J.; Lee, H.-S.; Cho, J. K.; Kim, Y. J. MnCo₂O₄ Spinels Supported Ruthenium Catalyst for Air-Oxidation of HMF to FDCA under Aqueous Phase and Base-Free Conditions. *Green Chem.*, **2017**, *19* (5), 1619–1623. <https://doi.org/10.1039/C7GC00027H>
- (141) Wang, S.; Zhang, Z.; Liu, B. Catalytic Conversion of Fructose and 5-Hydroxymethylfurfural into 2,5-Furandicarboxylic Acid over a Recyclable Fe₃O₄-CoOx Magnetite Nanocatalyst. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2015**, *3* (7), 406–412. <https://doi.org/10.1021/sc500702q>
- (142) Liu, B.; Ren, Y.; Zhang, Z. Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural into 2,5-Furandicarboxylic Acid in Water under Mild Conditions. *Green Chem.* **2015**, *17* (3), 1610–1617. <https://doi.org/10.1039/C4GC02019G>.
- (143) Saha, B. Porphyrin-Based Porous Organic Polymer-Supported Iron(III) Catalyst for Efficient Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethyl-Furfural into 2,5-Furandicarboxylic Acid. *J. Catal.* **2013**, *299* (5), 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2012.12.024>
- (144) Zhang, W.; Xie, J.; Hou, W.; Liu, Y.; Zhou, Y.; Wang, J. One-Pot Template-Free Synthesis of Cu-MOR Zeolite towards Efficient Catalyst Support for Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural under Ambient Pressure. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (35), 23122–23132. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b07675>
- (145) Zhou, X. The Excellent Catalyst Support of Al₂O₃ Fibers with Needle-like Mullite Structure and HMF Oxidation into FDCA over CuO/Al₂O₃ Fibers. *Ceramics international*, **2014** *45* (8), 2330–2337 <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.10.148>
- (146) Gupta, K.; Rai, R. K.; Dwivedi, A. D.; Singh, S. K. Catalytic Aerial Oxidation of Biomass-Derived Furans to Furan Carboxylic Acids in Water over Bimetallic Ni-Pd Alloy Nanoparticle. *ChemCatChem*, **2017** *14* (8); 2760–2767. <https://doi.org/10.1002/cctc.201600942>
- (147) Tirsoaga, A.; El Fergani, M.; Nuns, N.; Simon, P.; Granger, P.; Parvulescu, V. I.; Coman, S. M. Multifunctional Nanocomposites with Non-Precious Metals and Magnetic Core for 5-HMF Oxidation to FDCA. *Appl. Catal. B Environ.* **2020**, *278*, 119–309. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2020.119309>.
- (148) Lolli, A.; Maslova, V.; Bonincontro, D.; Basile, F.; Ortelli, S.; Albonetti, S. Selective Oxidation of HMF via Catalytic and Photocatalytic Processes Using Metal-Supported Catalysts. **2018** *23* (11). [10.3390/molecules23112792](https://doi.org/10.3390/molecules23112792)
- (149) Lei, D.; Yu, K.; Li, M.-R.; Wang, Y.; Wang, Q.; Liu, T.; Liu, P.; Lou, L.-L.; Wang, G.; Liu, S. Facet Effect of Single-Crystalline Pd Nanocrystals for Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethyl-2-Furfural. *ACS Catal.* **2017**, *7* (1), 421–432. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b02839>.
- (150) Donoeva, B.; Masoud, N.; de Jongh, P. E. Carbon Support Surface Effects in the Gold-Catalyzed Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural. *ACS Catal.* **2017**, *7* (7), 4581–4591. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b00829>.

- (151) Davis, S. E.; Houk, L. R.; Tamargo, E. C.; Datye, A. K.; Davis, R. J. Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural over Supported Pt, Pd and Au Catalysts. *Catal. Today* **2011**, *160* (1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2010.06.004>.
- (152) Davis, S. E.; Zope, B. N.; Davis, R. J. On the Mechanism of Selective Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to 2,5-Furandicarboxylic Acid over Supported Pt and Au Catalysts. *Green Chem* **2012**, *14* (1), 143–147. <https://doi.org/10.1039/C1GC16074E>.
- (153) Villa, A.; Schiavoni, M.; Campisi, S.; Veith, G. M.; Prati, L. Pd-Modified Au on Carbon as an Effective and Durable Catalyst for the Direct Oxidation of HMF to 2,5-Furandicarboxylic Acid. *ChemSusChem* **2013**, *6* (4), 609–612. <https://doi.org/10.1002/cssc.201200778>.
- (154) Sahu, R.; Dhepe, P. L. Synthesis of 2,5-Furandicarboxylic Acid by the Aerobic Oxidation of 5-Hydroxymethyl Furfural over Supported Metal Catalysts. *React. Kinet. Mech. Catal.* **2014**, *112* (1), 173–187. <https://doi.org/10.1007/s11144-014-0689-z>.
- (155) Zhang, Z.; Deng, K. Recent Advances in the Catalytic Synthesis of 2,5-Furandicarboxylic Acid and Its Derivatives. *ACS Catal.* **2015**, *5* (11), 6529–6544. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b01491>.
- (156) Yuan, H. Biocatalytic Production of 2,5-Furandicarboxylic Acid: Recent Advances and Future Perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2019**, *104* (16), 527–543. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10272-9>
- (157) Troiano, D. ; Orsat, V. ; Dumont, MJ. Status of Biocatalysis in the Production of 2,5-Furandicarboxylic Acid. *ACS Catal* **2020**, *10* (25), 9145–9169. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c02378>
- (158) van Deurzen, M. P. J.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Chloroperoxidase-Catalyzed Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural. *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16* (3), 299–309. <https://doi.org/10.1080/07328309708006531>.
- (159) McKenna, S. M.; Leimkühler, S.; Herter, S.; Turner, N. J.; Carnell, A. J. Enzyme Cascade Reactions: Synthesis of Furandicarboxylic Acid (FDCA) and Carboxylic Acids Using Oxidases in Tandem. *Green Chem* **2015**, *17* (5), 3271–3275. <https://doi.org/10.1039/C5GC00707K>
- (160) Karich, A.; Kleeberg, S. B.; Ullrich, R.; Hofrichter, M. Enzymatic Preparation of 2,5-Furandicarboxylic Acid (FDCA)—A Substitute of Terephthalic Acid by the Joined Action of Three Fungal Enzymes. *Microorganisms*. **2018**, *6* (12). [10.3390/microorganisms6010005](https://doi.org/10.3390/microorganisms6010005)
- (161) Dijkman, W. P.; Fraaije, M. W. Discovery and Characterization of a 5-Hydroxymethylfurfural Oxidase from *Methylovorus* Sp. Strain MP688. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80* (3), 9. [10.1128/AEM.03740-13](https://doi.org/10.1128/AEM.03740-13)
- (162) Dijkman, W. P.; Groothuis, D. E.; Fraaije, M. W. Enzyme-Catalyzed Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to Furan-2,5-dicarboxylic Acid. *Angew. Chem.* **2014**, *126* (25), 6633–6636. <https://doi.org/10.1002/ange.201402904>.
- (163) Wang, K.-F.; Liu, C.; Sui, K.; Guo, C.; Liu, C.-Z. Efficient Catalytic Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to 2,5-Furandicarboxylic Acid by Magnetic Laccase Catalyst. *ChemBioChem* **2018**, *19* (7), 654–659. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800008>.
- (164) Daou, M.; Yassine, B.; Wikee, S.; Record, E.; Duprat, F.; Bertrand, E.; Faulds, C. B. *Pycnoporus Cinnabarinus* Glyoxal Oxidases Display Differential Catalytic Efficiencies on 5-Hydroxymethylfurfural

- and Its Oxidized Derivatives. *Fungal Biol. Biotechnol.* **2019**, *6* (1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40694-019-0067-8>.
- (165) Dijkman, W. P.; Binda, C.; Fraaije, M. W.; Mattevi, A. Structure-Based Enzyme Tailoring of 5-Hydroxymethylfurfural Oxidase. *ACS Catal.* **2018**, *8* (5), 1833-1839. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00031>
- (166) Serrano, A.; Calviño, E.; Carro, J.; Sánchez-Ruiz, M. I.; Cañada, F. J.; Martínez, A. T. Complete Oxidation of Hydroxymethylfurfural to Furandicarboxylic Acid by Aryl-Alcohol Oxidase. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12* (1), 217. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1555-z>.
- (167) Viñambres, M.; Espada, M.; Martínez, A. T.; Serrano, A. Screening and Evaluation of New Hydroxymethylfurfural Oxidases for Furandicarboxylic Acid Production. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86* (16), <https://doi.org/10.1128/AEM.00842-20>.
- (168) Viña-Gonzalez, J.; Martinez, A. T.; Guallar, V.; Alcalde, M. Sequential Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to Furan-2,5-Dicarboxylic Acid by an Evolved Aryl-Alcohol Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2020**, *1868* (1), 140-293. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140293>.
- (169) Carro, J. Self-Sustained Enzymatic Cascade for the Production of 2,5-Furandicarboxylic Acid from 5-Methoxymethylfurfural. *Biotechnol Biofuels* **2018** *11*, (86). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1091-2>
- (170) Yuan, H.; Liu, Y.; Li, J.; Shin, H.; Du, G.; Shi, Z.; Chen, J.; Liu, L. Combinatorial Synthetic Pathway Fine-tuning and Comparative Transcriptomics for Metabolic Engineering of *Raoultella Ornithinolytica* BF60 to Efficiently Synthesize 2,5-furandicarboxylic Acid. *Biotechnol Bioeng.* **2018**, *5* (9), 2148-2155. [10.1002/bit.26725](https://doi.org/10.1002/bit.26725)
- (171) Yuan, H. Improved Production of 2,5-Furandicarboxylic Acid by Overexpression of 5-Hydroxymethylfurfural Oxidase and 5-Hydroxymethylfurfural/Furfural Oxidoreductase in *Raoultella Ornithinolytica* BF60. *Bioresour Technol.* **2018** *7*, 1184-1188. [10.1016/j.biortech.2017.08.166](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.166).
- (172) Koopman, F.; Wierckx, N.; de Winde, J. H.; Ruijsenaars, H. J. Identification and Characterization of the Furfural and 5-(Hydroxymethyl)Furfural Degradation Pathways of *Cupriavidus Basilensis* HMF14. *PNAS*, **2010** *107* (11) 4919-4924 ; <https://doi.org/10.1073/pnas.0913039107>
- (173) Yang, C.-F. Isolation of 5-Hydroxymethylfurfural Biotransforming Bacteria to Produce 2,5-Furan Dicarboxylic Acid in Algal Acid Hydrolysate. *J Biosci Bioeng.* **2018**, *125* (4), 407-412. [10.1016/j.jbiosc.2017.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.11.005)
- (174) Hossain, G. S.; Yuan, H.; Li, J.; Shin, H.; Wang, M.; Du, G.; Chen, J.; Liu, L. Metabolic Engineering of *Raoultella Ornithinolytica* BF60 for Production of 2,5-Furandicarboxylic Acid from 5-Hydroxymethylfurfural. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83* (1). <https://doi.org/10.1128/AEM.02312-16>.
- (175) Wu, S. A Novel 2,5-Furandicarboxylic Acid Biosynthesis Route from Biomass-Derived 5-Hydroxymethylfurfural Based on the Consecutive Enzyme Reactions. *Appl Biochem Biotechnol.* **2020** *191* (4), 1470-1482. [10.1007/s12010-020-03290-1](https://doi.org/10.1007/s12010-020-03290-1)

- (176) Rajesh, R. O.; Godan, T. K.; Rai, A. K.; Sahoo, D.; Pandey, A.; Binod, P. Biosynthesis of 2,5-Furan Dicarboxylic Acid by *Aspergillus Flavus* APLS-1: Process Optimization and Intermediate Product Analysis. *Bioresour. Technol.* **2019**, *284*, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.105>.
- (177) Cang, R.; Shen, L.-Q.; Yang, G.; Zhang, Z.-D.; Huang, H.; Zhang, Z.-G. Highly Selective Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to 5-Hydroxymethyl- 2-Furancarboxylic Acid by a Robust Whole-Cell Biocatalyst. *Catalysts*, **2019**, *15*. <https://doi.org/10.3390/catal9060526>
- (178) Sayed, M.; Pyo, S.-H.; Rehnberg, N.; Hatti-Kaul, R. Selective Oxidation of 5-Hydroxymethylfurfural to 5-Hydroxymethyl-2-Furancarboxylic Acid Using *Gluconobacter Oxydans*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7* (4), 4406–4413. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06327>.
- (179) Wen, M.; Zhang, X.-Y.; Zong, M.-H.; Li, N. Significantly Improved Oxidation of Bio-Based Furans into Furan Carboxylic Acids Using Substrate-Adapted Whole Cells. *J. Energy Chem.* **2020**, *41*, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2019.04.025>.
- (180) Datta, S.; Christena, L. R.; Rajaram, Y. R. S. Enzyme Immobilization: An Overview on Techniques and Support Materials. *3 Biotech* **2013**, *3* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.
- (181) Liu, D.-M.; Chen, J.; Shi, Y.-P. Advances on Methods and Easy Separated Support Materials for Enzymes Immobilization. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *102*, 332–342. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>.
- (182) Ikeda, S.; Sumi, Y.; Fukui, S. Application of Immobilized Aspartate Aminotransferase and Immobilized Aspartate Aminotransferase-Malate Dehydrogenase Coupled System to Micro-Assay of L-Aspartic Acid. *FEBS Lett.* **1974**, *47* (2), 295–298. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)81033-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)81033-1).
- (183) Cao, L. Carrier-Bound Immobilized Enzymes. **2005**, *580*. [10.1002/3527607668](https://doi.org/10.1002/3527607668)
- (184) Dold, S.-M.; Cai, L.; Rudat, J. One-Step Purification and Immobilization of a β -Amino Acid Aminotransferase Using Magnetic (M-PVA) Beads. *Eng. Life Sci.* **2016**, *16* (6), 568–576. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600042>.
- (185) Cassimjee, K. E.; Kadow, M.; Wikmark, Y.; Humble, M. S.; Rothstein, M. L.; Rothstein, D. M.; Bäckvall, J.-E. A General Protein Purification and Immobilization Method on Controlled Porosity Glass: Biocatalytic Applications. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (65), 9134–9137. <https://doi.org/10.1039/C4CC02605E>.
- (186) Dunbabin, A.; Subrizi, F.; Ward, J. M.; Sheppard, T. D.; Hailes, H. C. Furfurylamines from Biomass: Transaminase Catalysed Upgrading of Furfurals. *Green Chem.* **2017**, *19* (2), 397–404. <https://doi.org/10.1039/C6GC02241C>.
- (187) Schätzle, S.; Höhne, M.; Redestad, E.; Robins, K.; Bornscheuer, U. T. Rapid and Sensitive Kinetic Assay for Characterization of ω -Transaminases. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (19), 8244–8248. <https://doi.org/10.1021/ac901640q>.
- (188) Yun, H.; Kim, B.-G. Asymmetric Synthesis of (S)- α -Methylbenzylamine by Recombinant *Escherichia Coli* Co-Expressing Omega-Transaminase and Acetolactate Synthase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72* (11), 3030–3033. <https://doi.org/10.1271/bbb.80410>.
- (189) Cassimjee, K. E.; Kadow, M.; Wikmark, Y.; Humble, M. S.; Rothstein, M. L.; Rothstein, D. M.; Bäckvall, J.-E. A General Protein Purification and Immobilization Method on Controlled Porosity Glass:

- Biocatalytic Applications. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (65), 9134–9137. <https://doi.org/10.1039/C4CC02605E>.
- (190) Lancien, A.; Wojcieszak, R.; Cuvelier, E.; Duban, M.; Dhulster, P.; Paul, S.; Dumeignil, F.; Froidevaux, R.; Heuson, E. Hybrid Conversion of 5-Hydroxymethylfurfural to 5-Aminomethyl-2-furancarboxylic Acid: Toward New Bio-sourced Polymers. *ChemCatChem* **2020**, <https://doi.org/10.1002/cctc.202001446>.
- (191) Demidova, Yu. S.; Simakova, I. L.; Suslov, E. V.; Volcho, K. P.; Salakhutdinov, N. F.; Simakov, A.; Murzin, D. Yu. Catalytic Myrtenol Amination over Gold, Supported on Alumina Doped with Ceria and Zirconia. *Catal. Sustain. Energy* **2018**, 5 (1), 49–58. <https://doi.org/10.1515/cse-2018-0007>.
- (192) Kaur, J. Valorisation of Crude Glycerol to Value-Added Products: Perspectives of Process Technology, Economics and Environmental Issues. *Biotechnol. Rep.* **2020**, 23.
- (193) Li, Y.; Zhang, R.; Du, L.; Zhang, Q.; Wang, W. Catalytic Mechanism of C–F Bond Cleavage: Insights from QM/MM Analysis of Fluoroacetate Dehalogenase. *Catal. Sci. Technol.* **2016**, 6 (1), 73–80. <https://doi.org/10.1039/C5CY00777A>.
- (194) Saeedi, M.; Eslamifar, M.; Khezri, K. Kojic Acid Applications in Cosmetic and Pharmaceutical Preparations. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, 110, 582–593. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.006>.
- (195) Demidova, Yu. S.; Mozhaitsev, E. S.; Suslov, E. V.; Nefedov, A. A.; Saraev, A. A.; Volcho, K. P.; Salakhutdinov, N. F.; Simakov, A.; Simakova, I. L.; Murzin, D. Yu. Menthylamine Synthesis via Gold-Catalyzed Hydrogenation of Menthone Oxime. *Appl. Catal. Gen.* **2020**, 605, 117799. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2020.117799>.
- (196) L. Simakova, I.; V. Simakov, A.; Yu. Murzin, D. Valorization of Biomass Derived Terpene Compounds by Catalytic Amination. *Catalysts* **2018**, 8 (9), 365. <https://doi.org/10.3390/catal8090365>.
- (197) Demidova, Yu. S.; Simakova, I. L.; Estrada, M.; Beloshapkin, S.; Suslov, E. V.; Korchagina, D. V.; Volcho, K. P.; Salakhutdinov, N. F.; Simakov, A. V.; Murzin, D. Yu. One-Pot Myrtenol Amination over Au Nanoparticles Supported on Different Metal Oxides. *Appl. Catal. Gen.* **2013**, 464–465, 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2013.06.013>.
- (198) Demidova, Yu. S.; Suslov, E. V.; Simakova, I. L.; Mozhajcev, E. S.; Korchagina, D. V.; Volcho, K. P.; Salakhutdinov, N. F.; Simakov, A.; Murzin, D. Yu. Selectivity Control in One-Pot Myrtenol Amination over Au/ZrO₂ by Molecular Hydrogen Addition. *J. Mol. Catal. Chem.* **2017**, 426, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2016.10.034>.
- (199) Demidova, Yu. S.; Simakova, I. L.; Estrada, M.; Beloshapkin, S.; Suslov, E. V.; Volcho, K. P.; Salakhutdinov, N. F.; Simakov, A.; Murzin, D. Yu. One-Pot Myrtenol Amination over Au, Au–Pd and Pd Nanoparticles Supported on Alumina. *Catal. Lett.* **2019**, 149 (12), 3454–3464. <https://doi.org/10.1007/s10562-019-02958-6>.
- (200) Demidova, Yu. S.; Simakova, I. L.; Estrada, M.; Beloshapkin, S.; Suslov, E. V.; Korchagina, D. V.; Volcho, K. P.; Salakhutdinov, N. F.; Simakov, A. V.; Murzin, D. Yu. One-Pot Myrtenol Amination over Au Nanoparticles Supported on Different Metal Oxides. *Appl. Catal. Gen.* **2013**, 464–465, 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2013.06.013>.

- (201) Demidova, Yu. S.; Simakova, I. L.; Wärnå, J.; Simakov, A.; Murzin, D. Yu. Kinetic Modeling of One-Pot Myrtenol Amination over Au/ZrO₂ Catalyst. *Chem. Eng. J.* **2014**, *238*, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.007>.
- (202) Demidova, Yu. S.; Suslov, E. V.; Simakova, I. L.; Volcho, K. P.; Smolentseva, E.; Salakhutdinov, N. F.; Simakov, A.; Murzin, D. Yu. Promoting Effect of Alcohols and Formic Acid on Au-Catalyzed One-Pot Myrtenol Amination. *Mol. Catal.* **2017**, *433*, 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2017.02.040>.
- (203) Demidova, Yu. S.; Simakova, I. L.; Suslov, E. V.; Volcho, K. P.; Salakhutdinov, N. F.; Simakov, A.; Murzin, D. Yu. Catalytic Myrtenol Amination over Gold, Supported on Alumina Doped with Ceria and Zirconia. *Catal. Sustain. Energy* **2018**, *5* (1), 49–58. <https://doi.org/10.1515/cse-2018-0007>.
- (204) Demidova, Yu. S.; Suslov, E. V.; Simakova, I. L.; Mozhajcev, E. S.; Korchagina, D. V.; Volcho, K. P.; Salakhutdinov, N. F.; Simakov, A.; Murzin, D. Yu. One-Pot Monoterpene Alcohol Amination over Au/ZrO₂ Catalyst: Effect of the Substrate Structure. *J. Catal.* **2018**, *360*, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2018.01.020>.
- (205) Simakova, I. L.; Demidova, Yu. S.; Estrada, M.; Beloshapkin, S.; Suslov, E. V.; Volcho, K. P.; Salakhutdinov, N. F.; Murzin, D. Yu.; Simakov, A. Gold Catalyzed One-Pot Myrtenol Amination: Effect of Catalyst Redox Activation. *Catal. Today* **2017**, *279*, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.01.044>.
- (206) Simakova, I. L.; Demidova, Yu. S.; Estrada, M.; Beloshapkin, S.; Suslov, E. V.; Volcho, K. P.; Salakhutdinov, N. F.; Murzin, D. Yu.; Simakov, A. Gold Catalyzed One-Pot Myrtenol Amination: Effect of Catalyst Redox Activation. *Catal. Today* **2017**, *279*, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.01.044>.

Titre : Synthèse d'amines bio-sourcées à l'aide de procédés hybrides combinant des nanoparticules métalliques supportées et des transaminases

L'objectif de la catalyse hybride est d'exploiter les avantages des catalyseurs biologiques et chimiques afin d'accéder à de nouvelles voies de synthèse qui ne peuvent être réalisées indépendamment ou de réaliser des transformations qui ont montré de faibles rendements avec les approches conventionnelles. Le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) est une molécule plate-forme (ou building block) polyvalente pouvant être utilisée dans de nombreuses applications industrielles. En particulier, la synthèse de polymères aminés biosourcés représente une méthode prometteuse de valorisation de cette dernière. À ce jour, très peu d'études ont décrit la production de ces dérivés aminés et de leurs polymères. Trouver une méthodologie efficace pour transformer directement le HMF en acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) représente donc un défi important. Après avoir sélectionné le meilleur catalyseur d'oxydation pour la conversion du HMF en acide 5-aldéhyde-2-furancarboxylique et immobilisé une transaminase sur un support solide, nous avons pu mettre en œuvre le premier procédé catalytique hybride « one-pot/two-step » pour produire de l'AMFC (rendement de 77 %). Avec l'acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA, rendement de 23 %) comme produit secondaire unique, cela représente la méthode de production catalytique directe d'AMFC la plus efficace à partir du HMF rapportée à ce jour. De plus, un procédé hybride « one-pot/one-step » pour une production intégrée d'AMFC à partir de HMF a également été mis au point avec un rendement maximal de 17%, cela représente une première avancée pour cette molécule plate-forme, et une première réalisation pour la catalyse hybride française. Finalement, la synthèse d'un matériel multi-catalytique hybride combinant des nanoparticules de palladium et une transaminase, sur un support EziGTMOPAL, a pu être réalisée et son application a permis d'aboutir à un rendement final de 8 % en AMFC. Finalement, ce concept a également été appliqué à la conversion d'un panel de molécules bio-sourcées, avec en particulier la transformation du myrténol en son équivalent aminé selon un procédé en « one-pot two-step » avec à un rendement >99 %.

Mots-clés : catalyse hybride, HMF, transaminase, Oxydation

Title: Synthesis of bio-based amines using hybrid processes combining supported metal nanoparticles and transaminases

The objective of hybrid catalysis is to exploit the advantages of biological and chemical catalysts to access new synthetic routes that cannot be performed independently or to perform transformations that have shown low yields with conventional approaches. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) is a versatile platform (or building block) molecule that can be used in many industrial applications. In particular, the synthesis of biosourced amino polymers represents a promising method for its valorization. To date, very few studies have described the production of these amino derivatives and their polymers. Finding an efficient methodology to directly convert HMF to 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid (AMFC) is therefore a significant challenge. After selecting the best oxidation catalyst for the conversion of HMF to 5-aldehyde-2-furancarboxylic acid and immobilizing a transaminase on a solid support, we were able to implement the first "one-pot two-step" hybrid catalytic process to produce AMFC (77% yield). With 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA, 23% yield) as the sole by-product, this represents the most efficient direct catalytic production method of AMFC from HMF reported to date. In addition, a hybrid "one-pot one-step" process for integrated production of AMFC from HMF was also developed with a maximum yield of 17%, this represents a first breakthrough for this platform molecule, and a first achievement for French hybrid catalysis. Finally, the synthesis of a hybrid multi-catalytic material combining palladium nanoparticles and a transaminase, on an EziGTMOPAL support, was achieved and its application led to a final yield of 8% in AMFC. Finally, this concept was also applied to the conversion of a panel of bio-sourced molecules, with in particular the transformation of myrtenol into its amino equivalent according to a "one-pot two-step" process with a yield >99%.

Keywords: hybrid catalysis, HMF, transaminase, oxidation