Métalloenzymes artificielles : Nouvelle génération de catalyseurs efficaces pour l'hydrogénation énantiosélective

Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences
par

Myriem Skander

Chimiste diplômée de l'Université de Montpellier II (France)

Juin 2005

Devant le jury composé de :

Prof. Thomas Ward (directeur thèse)

Prof. Titus Jenny (expert externe, Université de Fribourg, Suisse)

Prof. Denis Sinou (expert externe, Université de Lyon, France)

Prof. Georg Süss-Fink (expert interne)

Dr. Christophe Malan (expert interne)

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Métalloenzymes artificielles: nouvelle génération de catalyseurs efficaces pour l'hydrogénation énantiosélective

Myriem SKANDER

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel, sur le rapport des membres du jury

T. Ward (directeur de thèse),
G. Süss-Fink, C. Malan
T. Jenny (Fribourg)
et D. Sinou (Lyon F)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 22 juin 2005

La doyenne:

Prof. M. Rahier

A mon père chéri et à ma mère adorée
et à mes deux sœurs Nadia et Samia-Louisa

Ce travail a été effectué dans le laboratoire des métalloenzymes artificielles sous la direction du professeur Thomas R. Ward que je tiens à remercier pour son accueil, la confiance qu'il m'a accordée et l'ensemble des connaissances qu'il m'a apportées durant ces 3 années et demie de thèse.

Je remercie les membres du jury de thèse, pour avoir pris le temps de lire ce manuscrit et de juger mon travail. Je remercie le professeur Denis Sinou de l'Université de Lyon, le professeur Titus Jenny de l'Université de Fribourg, le professeur Georg Süss-Fink de l'Université de Neuchâtel ainsi que le Dr. Christophe Malan de l'Université de Neuchâtel pour les innombrables conseils qu'il m'a donnés.

Je remercie les membres du groupe des métalloenzymes artificielles (anciens ou toujours présents) pour les moments passés ensemble que ce soit dans le cadre du travail ou dans un cadre privé. En particulier le Dr. Jêrome Collot, Dr. Julieta Gradinaru et Dr. Nicolas Humbert qui ont beaucoup contribués à l'aboutissement de ce projet. Mais aussi le Dr. Andrea Zocchi, Dr. Andreas Loosli, Jérôme Sauser et Edy Rusbandi pour leur précieuse collaboration à ce travail.

Je remercie l'ensemble des laboratoires de l'institut de chimie pour les interactions que nous avons pu avoir aussi bien professionnelles qu'amicales.

Je remercie aussi mes amis (collègues ou non) pour les bons moments passés ensemble et leur soutien lors des moments difficiles.

Enfin, je remercie les membres de ma famille pour leur soutien et la patience dont ils ont su faire preuve. Et enfin un grand merci à Temugin Berta pour son appui et sa présence durant ces années de thèse… à Temo, merci pour tout.

Sommaire

I. Abréviations 8

II. Abstract 10

III. Résumé 11

IV. Mots Clés 12

V. Introduction 13

1. Généralités 13
2. Catalyse chimique en phase homogène 15
   2.1. L'hydrogénation asymétrique 16
   2.2. Facteurs influençant la catalyse 22
      2.2.1. Approche théorique : influence de la première sphère de coordination 22
      2.2.2. Approche expérimentale : influence de la seconde sphère de coordination 24
3. Catalyse enzymatique 26
4. Comparaison catalyse homogène vs catalyse enzymatique 29
5. Métalloenzymes artificielles 31
   5.1. Incorporation covalente d'un catalyseur chimique dans une protéine 31
   5.2. Incorporation non covalente d'un catalyseur chimique dans une protéine 34
6. Système Biotine ⊂ (Strept)Avidine 37
   6.1. La Biotine 37
   6.2. La technologie Biotine-(Strept)Avidine 38
   6.3. Strepavidine et Avidine 39
      6.3.1. Avidine 39
      6.3.2. Streptavidine 41
   6.4. Interactions Biotine-(Strept)Avidine 42
7. Objectifs de la thèse 45

VI. Résultats et discussion 47

1. Préambule 47
2. Optimisation chimique 48
   2.1. Ligands biotinylés sans espaceur 48
   2.2. Ligands biotinylés avec espaceurs non chiraux 49
   2.3. Ligands biotinylés avec espaceurs chiraux 53
   2.4. Autres ligands biotinylés 56
3. Optimisation génétique 61

3.1. Avidine 61
3.2. Streptavidine 62
4. Hydrogénation énantiosélective par métalloenzymes artificielles 64
4.1. Détermination du nombre de sites actifs de la protéine 64
4.2. Conditions de catalyse 65
4.3. Catalyse sans protéine 67
4.4. Influence du pH et de la nature du tampon 69
5. Résultats de catalyse en présence de métalloenzymes artificielles 71
5.1. Criblage des ligands biotinylés sans et avec espaceurs achiraux 71
5.1.1. Catalyses en présence des protéines Wild Type (WT Sav et WT Avi) 72
5.1.2. Catalyses en présences des mutants (optimisation chimique et génétique) 74
5.2. Spécificité du substrat 78
5.3. Criblage des ligands biotinylés avec espaceurs chiraux 79
6. Détermination des constantes de vitesse de la catalyse 84
7. Influence de la température sur la catalyse en présence de protéine 87
8. Influence des solvants organiques 89
8.1. Effet du solvant dans un système homogène 90
8.1.1. Nature du solvant 90
8.1.2. Quantité de solvant 91
8.2. Effet du solvant dans un système biphasique 96
VII. Conclusion 98
VIII. Partie expérimentale 101
1. General 101
1.1. Reagents and solvents 101
1.2. Chromatography 102
1.3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) 103
1.4. Mass Spectrometry 103
1.5. Catalysis glasses and equipment 103
1.6. Buffers 104
2. Synthesis of biotinylated amidodiphosphine Biot–1 and Biot–2. 104
3. Synthesis of biotinylated amidodiphosphine ligands with 3^n or 4^q spacers 105
4. Synthesis of Boc-Amino acid Diphosphine Precursors 106
4.1. General Procedure for the Synthesis of Boc-Phe-1 106

4.2. General Procedure for the Synthesis of Boc-Pro-1 107

4.3. General Procedure for the Synthesis of Boc-Phe-2 108

4.4. General Procedure for the Synthesis of Boc-Pro-2 109

5. Deprotection of Boc-Amino acid Diphosphine; general procedure: 110
6. Synthesis of biotinylated amidodiphosphine ligands with Phe or Pro spacers 110
6.1. Biot-(*S*)-Phe-1 110

6.2. Biot-(*R*)-Phe-1 111

6.3. Biot-(*S*)-Pro-1 112

6.4. Biot-(*R*)-Pro-1 114

6.5. Biot-(*S*)-Phe-2 115

6.6. Biot-(*R*)-Phe-2 116

6.7. Biot-(*S*)-Pro-2 117

6.8. Biot-(*R*)-Pro-2 118

7. [*N*1,*N*3-bis(alloc)]Biotin pentafluorophenyl ester (Biot(Alloc)$_2$OC$_6$F$_5$) 119
8. [*N*1,*N*3-bis(alloc)]Biotin bis(diphenylphosphino)phenoxazine 120
9. Biotin bis(diphenylphosphino)phenoxazine 121
10. Preparation of [Rh(COD)(Biot-spacer)]$^+$BF$_4^-$ complexes for catalysis 122
10.1. General procedure 122

10.2. Procedure for the screening in the presence of miscible solvents (EtOH, MeOH, Acetone, THF and DMF) 122

10.3. Procedure for the screening of non-miscible solvents (EtOAc) 122

11. Hydrogenation protocol 123
11.1. Hydrogenation using either acetate or MOPS as buffer 123

11.2. Hydrogenation using phosphate buffer 123

11.3. Hydrogenation at different temperatures 124

11.4. Determination of protein acceleration 124

11.5. Hydrogenation of a mixture of *N*-acetamidoacrylic and *N*-acetamidocinnamic acids 125

12. Determination of enantiomeric excess 125
IX. Réferences 126

I. Abréviations

Avi: Avidine

Boc : tert-butoxycarbonyle

CDMT : 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine

COD : 1,5-Cyclooctadiène

Conv. : Conversion

DACA : 4-Diméthylaminocinnamaldéhyde

DCC : N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide

DMAP : 4-Diméthylaminopyridine

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ee : Excès énantiomérique

Equiv. : Equivalent

Et : Ethyl

GC : Chromatographie en phase gazeuse

HCl : Acide chlorhydrique

Hz : Hertz

M : Molaire

Me : Méthyle

MOPS : Acide 3-(*N*-morpholino)propanesulfonique

MES : Acide 2-(*N*-morpholino)éthanesulfonique

Na_2HPO_4 : Hydrogénocarbonate de di-sodium

NaH : Hydrure de sodium

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

NMM : 4-*N*-Méthylmorpholine

ppm : Partie par million

Rdt : Rendement

Sav : Streptavidine

T : Température

t : Temps

t.a. : Température ambiante

TFA : Acide trifluoroacétique

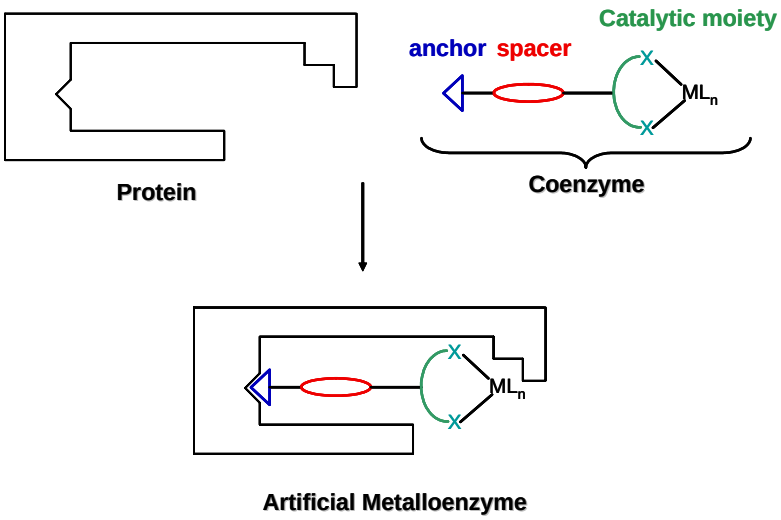
THF : Tétrahydrofurane

tr : Temps de rétention

II. Abstract

Homogeneous and enzymatic catalysis offer complementary means to generate enantiomerically pure compounds. Incorporation of achiral biotinylated aminodiphosphine–rhodium complexes in (strept)avidin affords enantioselective hydrogenation catalysts. The synthesis of several ligands combined to the genetic optimization (i.e. : chemogenetic optimization) allows to optimize the enantioselectivity for the reduction of *N*-α-acetamidoacrylic and *N*-α-acetamidocinnamic acids (up to 96 % ee (*R*) and 91% ee (*S*) in streptavidin and up to 90 % (*S*) in avidin). It is shown that the optimal operating conditions for the enantioselective reduction are 5 bars at 30 °C with a 1% catalyst loading. In addition, streptavidin display protein-accelerated catalysis as the protein embedded catalyst display 2.3 fold acceleration over the background reaction with a catalyst devoid of protein. The optimization of this system allows to create an efficient catalyst for the reduction of prochiral enamides in biphasic medium.

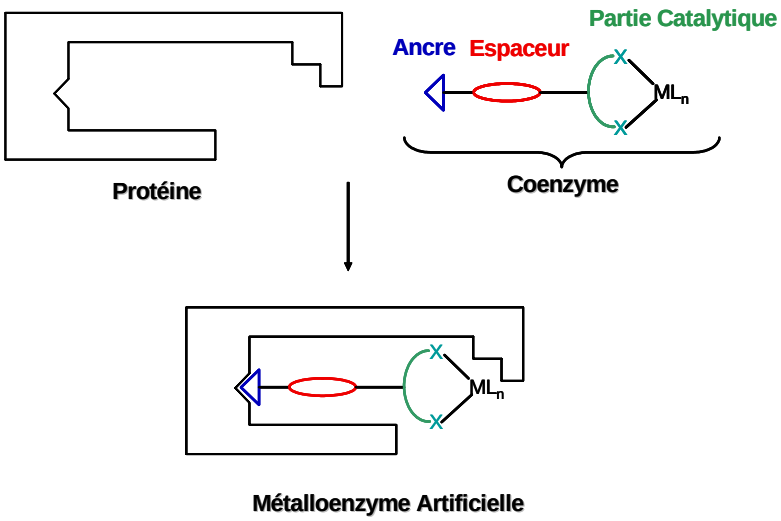
Such artificial metalloenzymes based on the biotin–avidin technology display features that are reminiscent of both homogeneous and of enzymatic catalysis.



III. Résumé

La catalyse chimique en phase homogène ainsi que la catalyse enzymatique sont deux méthodes complémentaires pour la préparation de composés énantiomériquement purs. Grâce à l'incorporation d'un complexe de rhodium – aminodiphosphine biotinylé dans la (strept)avidine, il est possible d'obtenir un catalyseur hybride pour l'hydrogénation énantiosélective. La synthèse de différents ligands combinée à l'optimisation génétique (i.e. : optimisation chemo-génétique), permet d'optimiser l'énantiosélectivité pour la réduction de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique et de l'acide *N*-α-acétamidocinnamique (96 % ee (*R*) et 91% ee (*S*) dans la streptavidine et jusqu'à 90 % (*S*) dans l'avidine). Ainsi les conditions de catalyse pour la réduction énantiosélective sont optimales à 5 bars, 30 °C et en présence de 1% de catalyseur. De plus, la streptavidine permet une accélération de la catalyse 2.3 fois supérieure à une réaction sans protéine. L'optimisation de ce système a permis de créer un catalyseur efficace pour la réduction d'énamides prochirales en milieu biphasique.

De telles métalloenzymes artificielles basées sur la technologie biotine – avidine présentent des propriétés caractéristiques à la catalyse homogène et enzymatique.



IV. Mots Clés

Catalyse homogène, catalyse enzymatique, (Strept)Avidine, optimisation chemo-génétique, hydrogénation énantiosélective, ligand diphosphine.

V. Introduction

1. Généralités

Aujourd'hui, la synthèse de produits énantiomériquement purs est un défit permanent pour l'industrie, car la majorité des systèmes biologiques reconnaissent les deux énantiomères d'un substrat comme deux composés différents. Les exemples de produits pharmaceutiques dont les propriétés biologiques dépendent de la configuration absolue sont nombreux (Figure 1), l'exemple le plus marquant est celui de la thalidomide administrée sous forme racémique dans les années 60 aux femmes enceintes, qui sous sa forme (*R*) est un sédatif alors que sa forme (*S*) provoque des malformations chez les nouveaux nés.[1]

C'est en 1992 la FDA (Food and Drug Administration) a imposé l'étude biologique de chaque énantiomère d'un produit actif avant sa mise sur le marché. Cette contrainte a par la suite incité un grand nombre de laboratoires pharmaceutiques à commercialiser leurs médicaments sous la forme d'un énantiomère. Ainsi en 2000, on estimait à 40% le nombre de médicaments vendus au États-Unis sous la forme d'un seul énantiomère, et qu'aujourd'hui 80% des médicaments en phase de développement sont des produits énantiomériquement purs.[2] D'autre part, ces dernières années une nouvelle stratégie appelée "racemic switch" a vue le jour. Cette approche consiste à remplacer un produit racémique efficace arrivant en fin de brevet par sa nouvelle version énantiomériquement pure. Ainsi un médicament arrivé en fin de protection de brevet sera sans aucun doute remplacé par un médicament quasi-identique.[3]

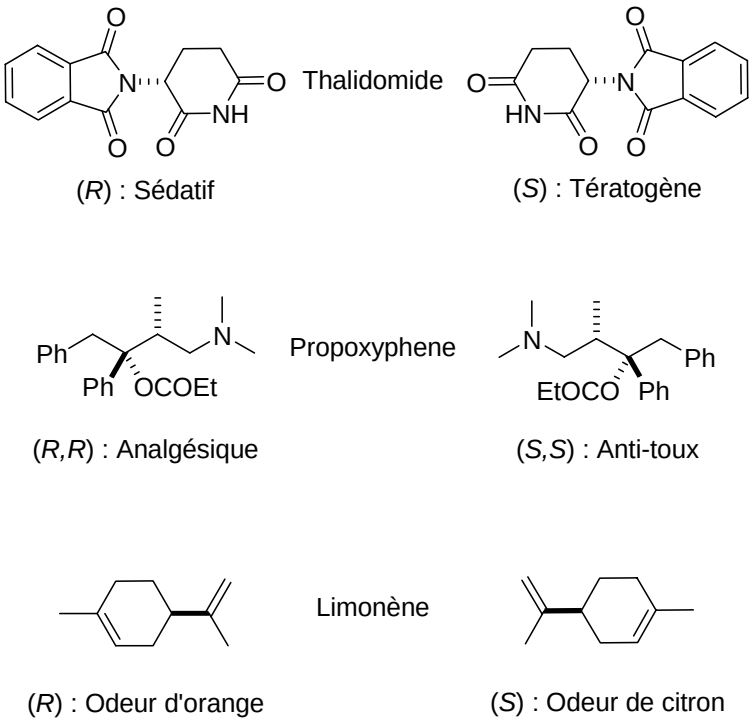


Figure 1. Exemples de produits chimiques dont les propriétés dépendent de leur configuration absolue.

On peut classer les différentes techniques permettant l'obtention de composés énantiopurs en trois méthodes:[4]

1. Par résolution cinétique d'un mélange racémique, ou par la séparation d'un mélange d'énantiomères (recristallisation ou HPLC). Cependant, l'inconvénient majeur de ces techniques est la perte de la moitié du produit de départ, puisque les rendements ne peuvent pas dépasser les 50%.

2. Par transformation ou dérivatisation de produits naturels chiraux (chiral pool) comme des aminoacides, terpènes, carbohydrates, acides tartrique et lactique, et alcaloïdes. Cette méthode intéressante dépend principalement de la disponibilité commerciale des produits de départ.

3. Par réaction énantiosélective (stoechiométrique ou catalytique) utilisant des auxiliaires chiraux qui peuvent être soit liés au substrat, au réactif ou au catalyseur, mais qui sont éliminés ou recyclés en fin réaction.

La catalyse asymétrique, qu'elle soit chimique (homogène ou hétérogène) ou enzymatique, possède de loin le plus fort potentiel pour l'obtention de molécules optiquements actives. Cette méthode qui utilise de faibles quantités de catalyseurs, permet la production de produits naturels ou non naturels tout en permettant dans quelques cas le recyclage du catalyseur.[5]

2. Catalyse chimique en phase homogène

L'utilisation de complexes de métaux de transition pour la catalyse a connu un grand intérêt durant ces dernières années. La chimie organométallique a permis de développer de nouvelles méthodes de synthèses très efficaces, principalement en catalyse asymétrique. La recherche dans ce domaine a d'ailleurs été récompensée en 2001 par le Prix Nobel de chimie qui a été décerné à Ryoji Noyori[6] et Williams Knowles[7] pour leur travail sur l'hydrogénation asymétrique, et à Barry Sharpless[8] pour son travail sur l'oxydation asymétrique.

Les cycles catalytiques sont généralement représentés comme sur la Figure 2, dans le mélange réactionnel nous disposons généralement dans un premier temps d'un précatalyseur (entouré de ligands neutres ou anioniques) qui est converti en catalyseur M actif. Ce dernier va alors activer les réactifs A et B pour former le produit A-B.

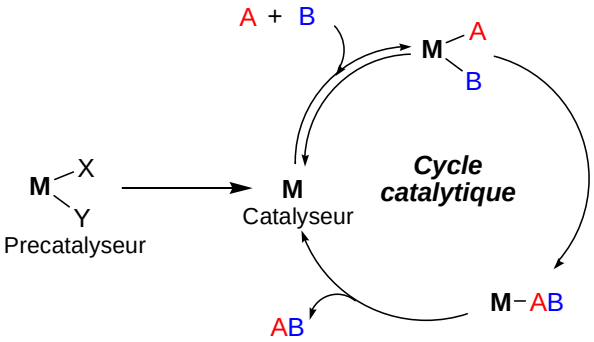


Figure 2. Représentation schématique d'un cycle catalytique.

2.1. L'hydrogénation asymétrique

La percée majeure en hydrogénation asymétrique date du début des années 70, quand Williams Knowles et ses collègues ont démontré qu'un complexe de rhodium contenant des ligands phosphines chiraux (chiralité sur l'atome de phosphore), comme le CAMP, est capable de catalyser l'addition énantiosélective de H_2 sur l'une des faces prochirale d'une oléfine, générant ainsi un centre de chiralité avec une forte énantiosélectivité.[9] Ce procédé a été rapidement commercialisé pour la production de médicament anti-Parkinson ((*S*)-DOPA) avec un excès énantiomérique de 90% (Figure 3**)**.[7]

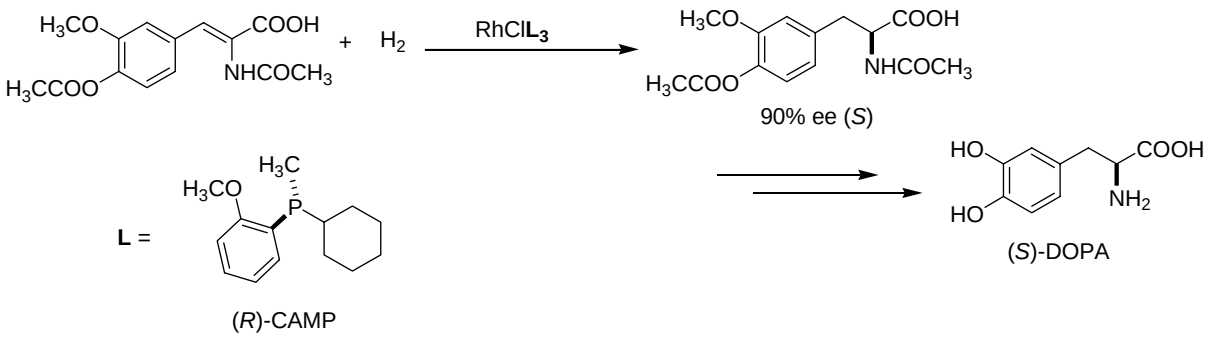


Figure 3. Préparation de la (*S*)-DOPA**.**

Ces résultats satisfaisants ont conduit pendant 35 ans au développement de nouveaux procédés dans ce domaine. La recherche s'est orientée vers la synthèse de nouveaux ligands phosphine bidentés. Kagan fut le premier a développer des ligands de symétrie C_2 avec la DIOP (Figure 5).[10,11] Ce ligand bisphosphine obtenu à partir de l'acide tartrique, se caractérise par le fait qu'il ne possède pas de chiralité sur les atomes de phosphore, comme pour la première génération de ligands monophosphines, mais sur les carbones adjacents. Par exemple, l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidocinnamique avec la (*R*, *R*)-DIOP permet de former *N*-acetylphenylalanine avec une pureté optique de 72 % en faveur de l'énantiomère (*R*).

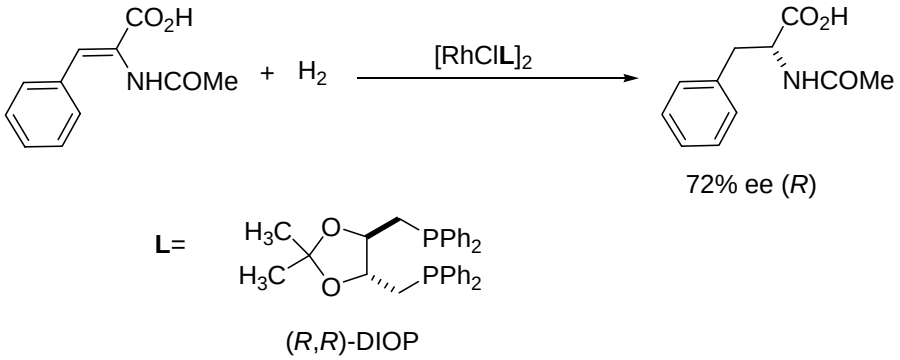
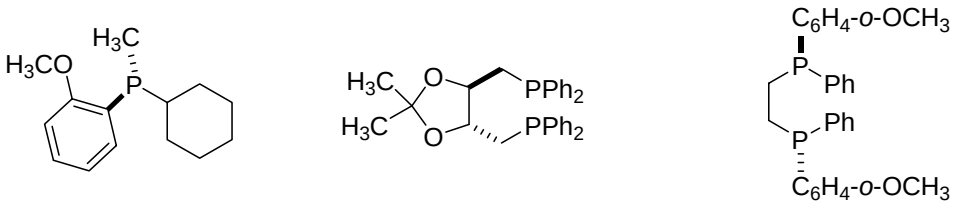


Figure 4. Hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidocinnamique avec la DIOP.

D'autre part, en se basant sur ses premiers ligands, Knowles créa un analogue DIPAMP bis-phosphine (Figure 5**)**,[12] découvrant ainsi un meilleur ligand que le CAMP pour la préparation industrielle de la (*S*)-DOPA (95% ee).[7]



(*R*)-CAMP 1970 | (*R*,*R*)-DIOP 1971 | (*R*,*R*)-DIPAMP 1974

Figure 5. Evolution des ligands phosphine pour l'hydrogénation asymétrique.

Dans les années 80, Noyori et Takaya[13] ont introduit en catalyse un nouveau ligand, le BINAP. Cette nouvelle génération de ligands dont la chiralité se fait par atropoisomérie, a permis la préparation de nouveaux complexes de ruthenium pour l'hydrogénation de divers alcènes et de cétones avec d'excellents excès énantiomériques. De plus, le BINAP qui est accessible sous ses

deux formes optiques, a connu plusieurs applications industrielles, comme pour la fabrication de motifs présents dans certains antibiotiques comme les carbapenèmes[14,15], mais aussi pour diverses fragrances comme le menthol.[14,15]

Avec l'arrivée du BINAP, les complexes de ruthénium (après le rhodium) ont connu un grand intérêt en catalyse (Figure 6). La différence majeure réside dans le fait que ces complexes, en hydrogénation asymétrique, catalysent un plus large éventail de réactions que les complexes de rhodium. Cependant, on compte aujourd'hui un plus grand nombre de complexes de phosphine-rhodium très efficaces en hydrogénation asymétrique.

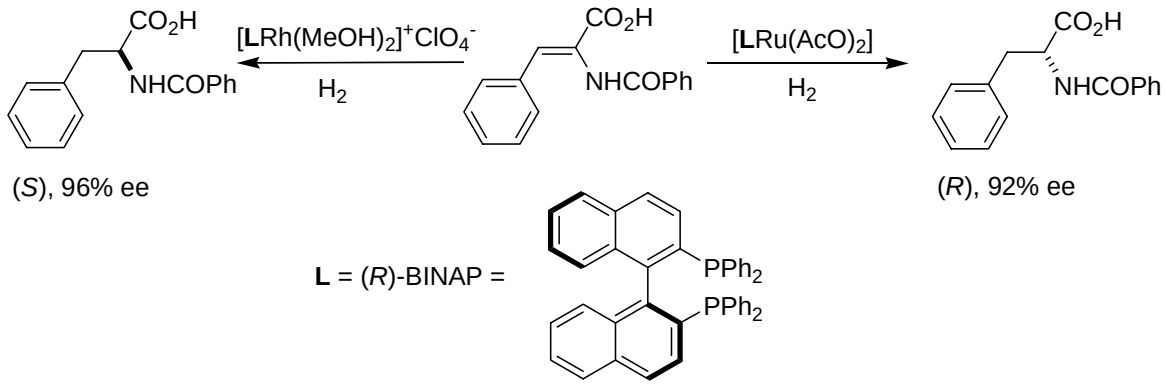


Figure 6. Hydrogénation d'une énamide prochirale à l'aide du (*R*)-BINAP.

D'autre part, Kumada et Hayashi ont développé de nouveaux ligands phosphine alliant la chiralité portée sur la chaîne carbonée adjacente à la chiralité planaire des ferrocènes. Ces ligands, faisant partie de la grande famille des JOSIPHOS[16], se sont révélés très actifs et sélectif pour l'hydrogénation des fonctions C=N, C=O, des liaisons C=C tetrasubstituées ainsi que de dérivés d'acide itaconique.[17] La plus importante application concerne la préparation d'un herbicide, le metolachlor, produit à 10000 tonnes par an par Syngenta (Figure 7).[18]

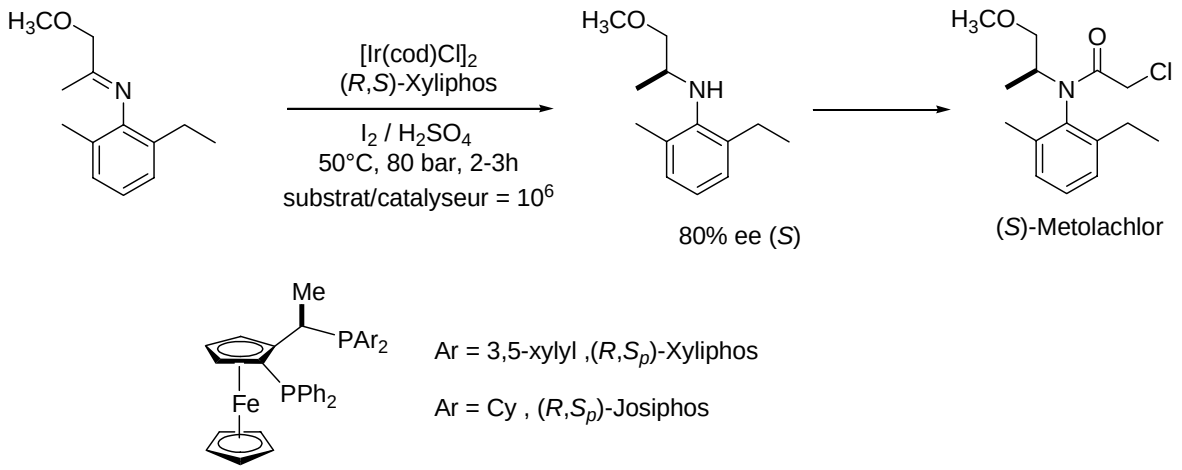


Figure 7. Synthèse industrielle du Metolachlor (Syngenta).

De plus, depuis les années 90 les ligands DuPHOS et ses analogues, créés par Burk, connaissent un grand succès.[19] Ces ligands de symétrie C_2 qui incluent le phosphore dans un cycle saturé chiral, sont considérés comme des ligands “polyvalents” capables d’hydrogéner un grand nombre de substrats avec de très bons ees et une grande tolérance aux groupes fonctionnels.[17] Par exemple, l’une des applications de la Me-DuPHOS en industrie est pour la préparation du précurseur de la candoxatril (Pfizer) (Figure 8). L’utilisation de ce ligand permet la production de la (*S*)-cyclopentaneglutarate avec un ee > 99% et dans des conditions opératoires douces.[20]

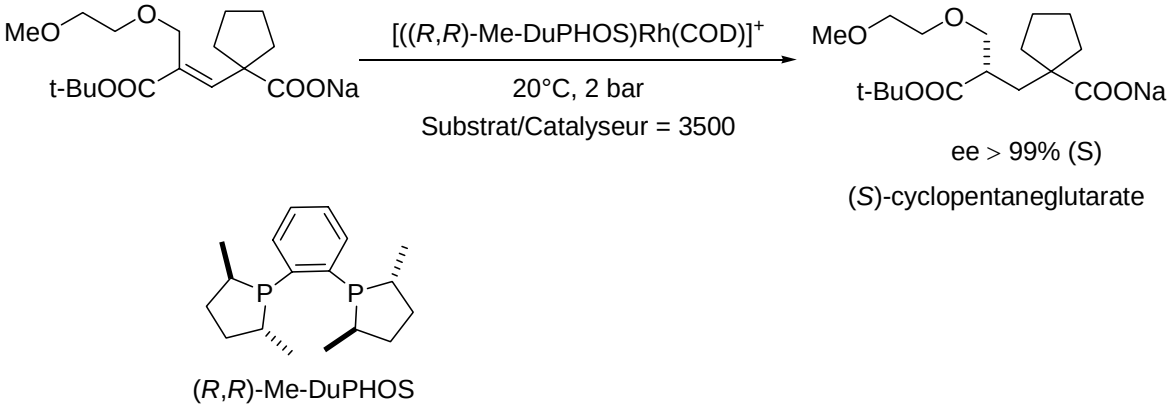


Figure 8. Synthèse industrielle du précurseur de la Candoxatril (Pfizer).

Aujourd'hui, le nombre de ligands chiraux décrient en littérature pour l'hydrogénation asymétrique est très important. Contrairement à leurs applications au niveau académiques, il n'existe que quelques ligands couramment utilisés en industrie pour la préparation de molécules cibles (Figure 9).[17]

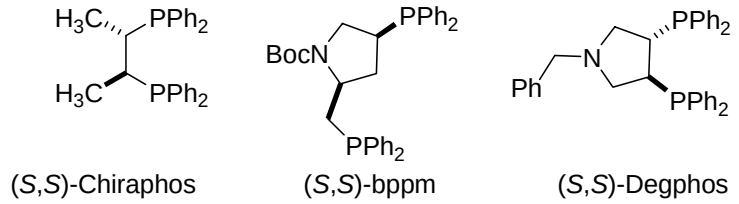


Figure 9. Exemple de quelques ligands utilisés en hydrogénation asymétrique en industrie.

2.2. Facteurs influençant la catalyse

2.2.1. Approche théorique : influence de la première sphère de coordination

Une grande partie des ligands utilisés en hydrogénation asymétrique sont des diphosphines de symétrie C_2. Ces ligands peuvent former en se coordonnant au métal des cycles à 5, 6 ou 7 chaînons, la rigidité du système implique alors une certaine disposition des groupements aryles sur les atomes de phosphore limitant ainsi l'espace accessible au substrat. Deux dispositions sont possibles : en axiale ou équatoriale. Les groupements aryles occupant les positions axiales se présentent en "edge-on" par rapport au substrat, alors que les paires équatoriales sont "face-on". Des études ont montré que les positions "face-on" en équatoriales exercent une gêne stérique plus importante aux niveau des sites de coordination du substrat. De plus, l'espace qu'occupent ces groupements aryles dépend de la configuration absolue du ligand.[21] Par exemple, dans le cas du (*R*)-BINAP les quadrants 1 et 3 présentent les groupements phényles en "edge-on" alors que les quadrants 2 et 4 sont "face-on" (Figure 10).[22]

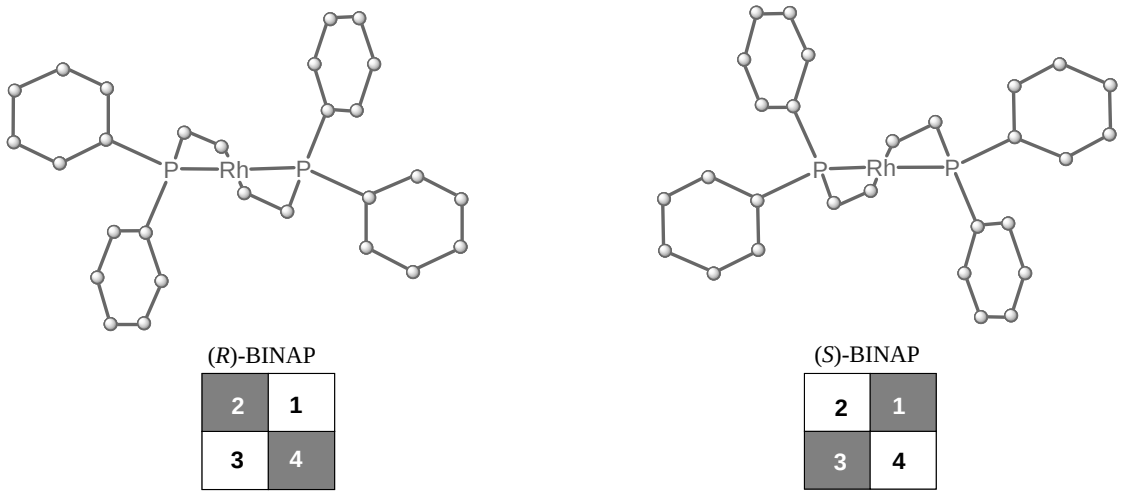


Figure 10. Règle des Quadrants ; les quadrants en gris représentent les groupements phenyles en position équatoriale"face-on", les quadrants en blanc les phenyles en position axiale "edge-on".

La complexation du substrat prochiral au métal peut conduire à deux formes diastéréoisomères (Ligand-Métal-Substrat) dans le cycle catalytique. Par exemple, dans le cas d'un ligand où les quadrants 2 et 4 (Figure 10) sont occupés par des phényles en position équatoriale, une énamide prochirale peut se positionner soit sur sa face *Si* (Figure 11) et former ainsi le diastéréoisomère le plus stable ou sur sa face *Re* pour former le diastéréoisomère le plus défavorisé (répulsion entre le groupement acide et le groupement phényle en équatorial).[23] L'énantiosélectivité dépend alors de l'équilibre entre les deux formes diastéréoisomériques et de leur réactivité respective.[24-26] Ainsi dans le cas de l'hydrogénation énantiosélective avec des complexes de (*R*)-BINAP-rhodium, le diastéréoisomère le plus stable réagit plus lentement que le diastéréoisomère le moins stable vis-à-vis de H_2, ce qui conduit à la formation du produit d'hydrogénation (*S*) (Figure 6).[22]

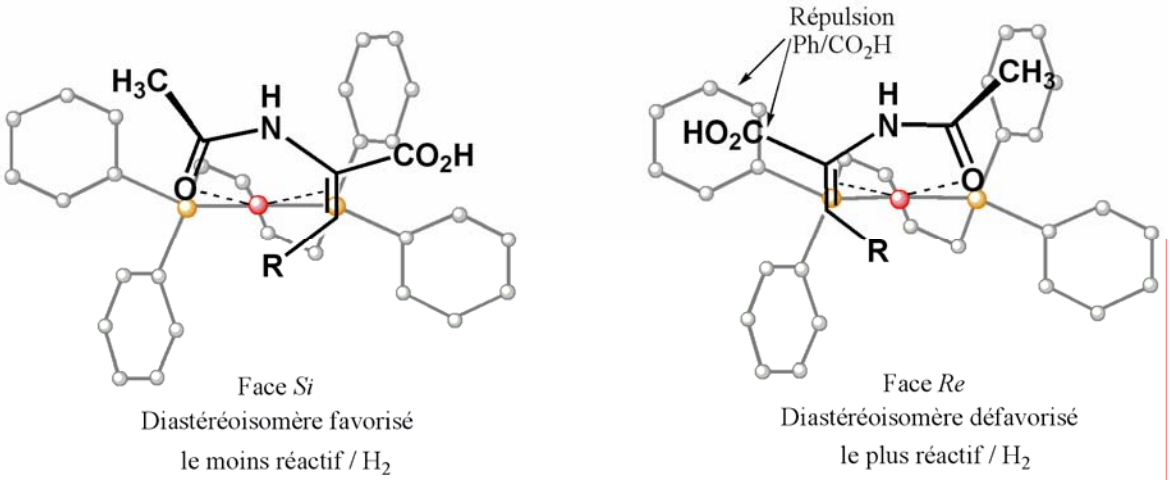


Figure 11. Positionnement d'une enamide prochirale sur un complexe (*R*)-BINAP-rhodium.

Grâce au mécanisme proposé par Halpern[24] et Brown[26] pour l'hydrogénation énantiosélective et au model des quadrants[21], il est possible de mieux comprendre l'influence de la première sphère de coordination (des ligands liés au métal) dans la prédiction de l'énantiosélectivité. Cette approche reste néanmoins théorique et ne prend pas en considération les facteurs pouvant influencer la catalyse au niveau expérimental.

2.2.2. Approche expérimentale : influence de la seconde sphère de coordination

Afin d'augmenter les chances de découvrir le meilleur catalyseur et de faire face aux difficultés de prédiction de l'énantioselectivité, il est utile de cribler plusieurs combinaisons de catalyseurs et de conditions opératoires. La chimie combinatoire est donc un outil important pour catalyse asymétrique, cette méthode a d'ailleurs permis de mettre en évidence et développer de nouveaux catalyseurs.[27,28] Cette approche a montré que plusieurs paramètres expérimentaux peuvent influencer la catalyse, comme par exemple le solvant, le contre-ion ainsi que différents additifs.[29] Ces faibles interactions entre le catalyseur et son environnement sont définies comme étant la seconde sphère de coordination.

De récents travaux de Pfaltz montrent dans le cas de l'hydrogénation asymétrique d'une oléfine non fonctionnalisée avec un catalyseur cationique d'iridium-PHOX, que l'activité dépend fortement du contre-ion (Figure 12). En présence d'anions comme BF_4^- et $CF_3SO_3^-$ on observe une inhibition totale de la réaction, alors qu'avec $[Al(OC(CF_3)_3)_4]^-$, BAr_F^- et $[B(C_6F_5)_4]^-$ comme contre-ions le catalyseur est plus réactif et plus stable.[30]

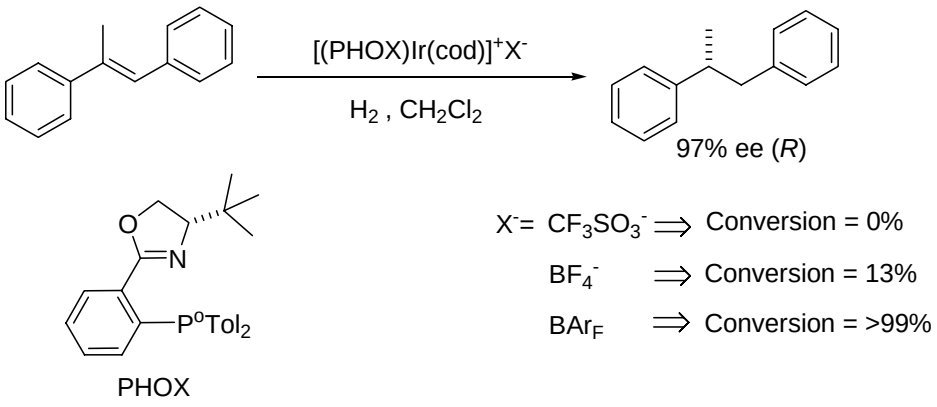


Figure 12. Hydrogénation asymétrique à l'aide de complexes d'iridium.

L'exemple le plus marquant reste celui décrit par Togni pour les réactions d'amination allylique avec des complexes de palladium (Figure 13), où l'on peut observer qu'en changeant le contre-ion PF_6^- par F^- on passe d'un excès énantiomérique de 7% à 98.7%.[31]

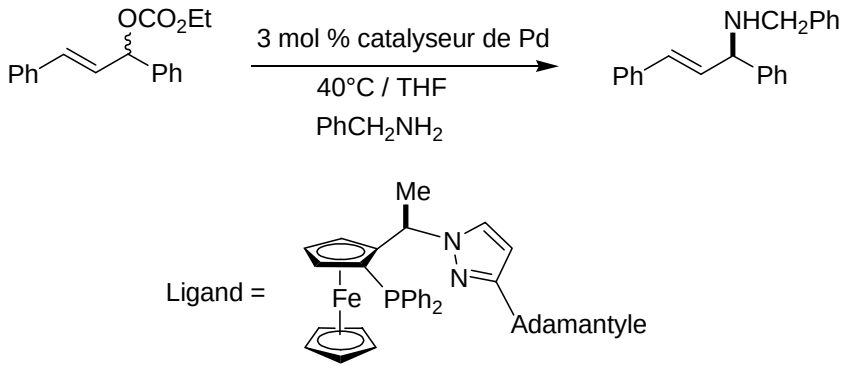


Figure 13. Amination allylique à l'aide de complexes de palladium.

En catalyse chimique avec des complexes organométalliques, seule la première sphère de coordination est bien définie (i.e. : les ligands directement liés au métal), par contre les interactions de molécules environnantes qui interagissent via des liaisons faibles avec cette première sphère coordination (seconde sphère coordination du métal), restent difficile à définir même s'ils influencent sur la réaction.

3. Catalyse enzymatique

Les enzymes sont des protéines capables de catalyser des réactions chimiques et leur effet catalytique est beaucoup plus performant que les systèmes synthétiques. La partie de l'enzyme responsable de l'activité catalytique est appelée « site actif » où le substrat se lie généralement de manière non-covalente, l'environnement chiral de ce site permet alors d'avoir une chimio-, régio- et stéréosélectivité au cours de la catalyse. Les sites actifs des enzymes contiennent souvent des composantes organiques ou inorganiques, autres que des acides aminés (par ex. vitamines (biotine, vitamine B_{12}…..etc), Fe^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} ou Mg^{2+}), qui sont essentielles pour l'activité catalytique et qu'on appelle cofacteurs ou coenzymes.[32]

Les réactions catalysées par les enzymes sont nombreuses et diverses, elles peuvent par exemple catalyser des réactions d'hydrolyse (hydrolases), l'addition de groupement fonctionnels (lyases), le transfert de groupes dans une même molécule (isomérases) et la formation de liaisons C-C, C-S, C-O et C-N (ligases)…etc

Plus de la moitié des catalyseurs enzymatiques sont des métalloenzymes, comme par exemple la méthyltransferase qui contient la co-enzyme B_{12}. La vitamine B_{12}, présente dans le corps humain, est un complexe de cobalt (III) qui possède un ligand plan comportant quatre atomes

d'azotes liés au métal et qu'on appelle ligand corrine (Figure 14). Cette co-enzyme agit avec la méthyltransferase pour catalyser le transfert d'un méthyle sur plusieurs substrats.[32]

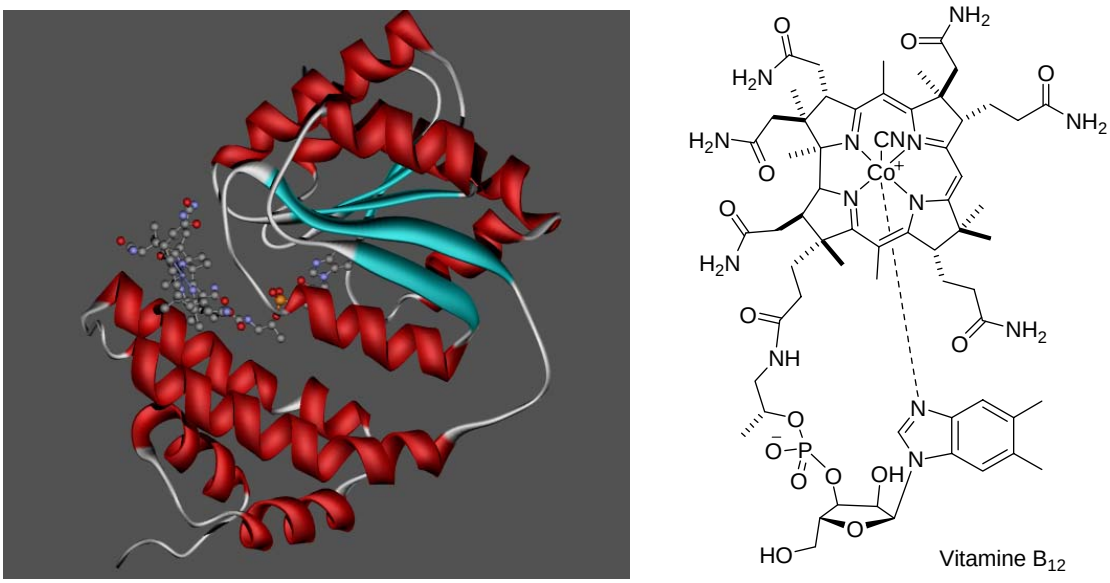


Figure 14. Représentation du monomère de la méthyltransferase contenant la co-enzyme B_{12}.

En chimie l'application la plus fréquente des enzymes est celle de la résolution cinétique d'un mélange racémique, comme par exemple pour la production d'amines chirales (Figure 15**)**.[33,34]

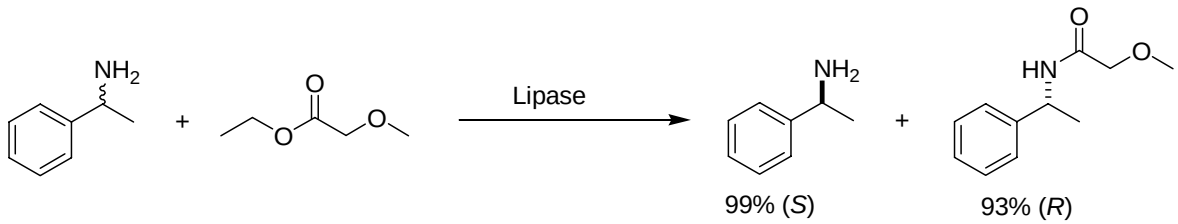


Figure 15. Résolution cinétique d'une amine racémique à l'aide d'une lipase.

Plusieurs enzymes sont commercialisés pour des transformations énantiosélectives. Cependant, les inconvénients dû à la spécificité du substrat, la stabilité et la formation d'une seule forme énantiomérique sont des facteurs limitants.[35] L'optimisation génétique combiné au criblage à haut débit ont permis de manière significative de mettre en évidence de nouvelles enzymes non naturelles (des mutants) beaucoup plus efficaces.[36-39]

Il existe plusieurs exemples où l'optimisation génétique apporte une amélioration de l'énantiosélectivité. Reetz a montré dans le cas de la résolution cinétique d'un ester racémique, catalysée par une lipase de *Pseudomona aerugosina* (Figure 16), qu'à partir de la protéine Wild-type dont le facteur de sélectivité E est de 1.1 en faveur de la forme (*S*), il est possible après plusieurs cycles mutations d'améliorer la sélectivité de cette enzyme et d'obtenir deux mutants dont les facteurs de sélectivité E sont respectivement supérieur à 51 en faveur de la forme (*S*) et égale à 30 en faveur de la forme (*R*).[40]

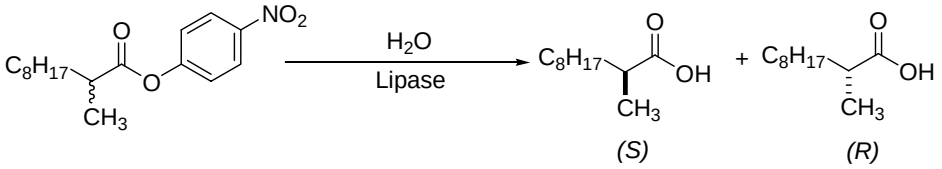


Figure 16. Résolution cinétique d'un ester racémique par une lipase.

De plus, les récents travaux de Reetz sur la cylohexanone monooxygénase (CHMO, une enzyme dépendante de la flavine) utilisée comme catalyseur pour les réactions de Baeyer-Villiger, ont montré des résultats intéressants. D'une part, sur le criblage de 10000 mutants il est possible de varier la direction et d'augmenter le degrés d'énantiosélectivité pour la catalyse de différents dérivés de cyclohexanones (Figure 17a).[41] D'autre part, que le double criblage de ces

10000 mutants pour un autre type de réaction (oxydation de thioethers)[42], a mis en évidence un mutant permettant la catalyse de Baeyer-Villiger sur la 4-methoxycyclohexanone avec un excès énantiomérique de 98.6% en faveur de l'énantiomère (*S*) (Figure 17a), et un excès énantiomérique 98.7% en faveur de l'énantiomère (*R*) pour l'oxydation de thioethers (Figure 17b).

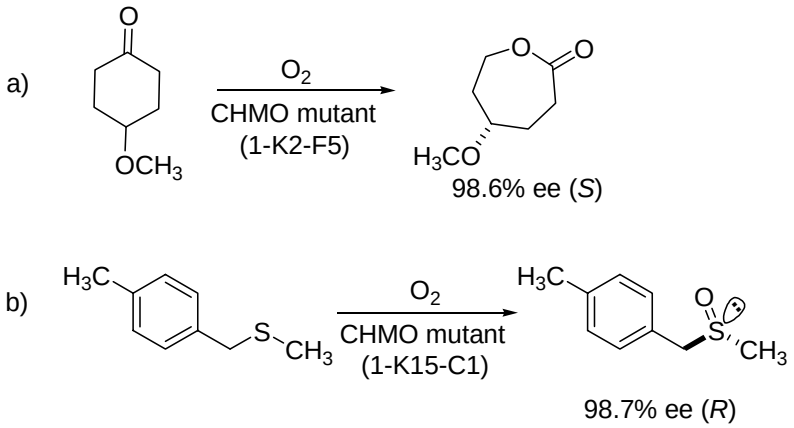


Figure 17. Réactions d'oxydation en présence de deux mutants identiques de la CHMO (1-K2-F5 et 1-K15-C1). a) réactions de Baeyer-Villiger. b) oxydation de thioethers.

4. Comparaison catalyse homogène vs catalyse enzymatique

Pour les enzymes l'efficacité et sélectivité du système catalytique dépendent autant de la première que la deuxième sphère de coordination de leur site actif. Cette caractéristique est particulièrement difficile à définir pour les catalyseurs homogènes, puisque le contrôle électronique et stérique se limite à la première sphère de coordination du métal. Cependant, le rôle du solvant et du contre ion (seconde sphère de coordination) en catalyse homogène reste déterminant dans la performance du catalyseur. D'autre part, contrairement aux enzymes les

catalyseurs homogènes ne sont pas spécifiques à un seul substrat, et tolèrent une variation de la taille du substrat, comme par exemple en hydrogénation asymétrique ou les acides *N*-α-acetamidoacrylique *N*-α-acetamidocinnamique sont, malgré leur différence de taille, deux bons substrats. Cependant, la spécificité des catalyseurs homogène face à plusieurs fonctionnalités sur un substrat reste mauvaise, les biocatalyseurs restent spécifiques à une seule fonctionnalité, et ne nécessitent pas l'utilisation de groupes protecteurs.[43]

Le milieu naturel des enzymes étant aqueux, les procédés enzymatiques sont moins polluants que les méthodes de synthèse chimique. Mais de ce fait, leurs applications industrielles sont en général limitées à des réactions mettant en jeu des substrats solubles dans l'eau.

	Catalyse homogène	Catalyse enzymatique
Enantiomères	2 énantiomères obtenus	1 seul énantiomère
Répertoire de réaction	Grand	Petit
Nombre de turnovers	Faible	élevé
Compatibilité avec les solvants	Grande	Faible (aqueux)
Optimisation	Chimique	Génétique
Seconde sphère de coordination	Mal définie	Bien définie
Tolérance pour groupements fonctionnels	Faible	Grande
Variété de substrat	Grande	Limitée

Tableau 1. Différences entre la catalyse homogène et la catalyse enzymatique.

A partir de ces considérations il apparaît que la catalyse enzymatique et homogène sont deux outils complémentaires. Dans un esprit biomimétique, les efforts de plusieurs groupes de recherche se sont tourné vers la création de nouvelles metalloenzymes artificielles enantioselectives.[44] L'incorporation d'un catalyseur organométallique, qui assure l'activité, dans une protéine hôte conduirait à un catalyseur hybride possédant une seconde sphère de coordination bien définie grâce à la protéine hôte. Un tel système devrait posséder les propriétés des deux mondes de la catalyse homogène et enzymatique.

Afin d'assurer la présence du catalyseur organométallique dans la cavité de la protéine hôte, l'incorporation peut se faire de manière covalente ou supramoléculaire (non covalente).

5. Métalloenzymes artificielles

5.1. Incorporation covalente d'un catalyseur chimique dans une protéine

Inspirés des travaux de Kaiser[45], un des moyens d'incorporer un catalyseur dans d'une protéine de manière covalente est de crée un pont disulfure à partir d'une cystéine se trouvant dans la cavité de la protéine. De nombreux groupes de recherche ont récemment développé cette méthode pour permettre l'incorporation covalente de catalyseurs de métaux de transition dans des diverses protéines.

Dans le but de créer une metalloenzyme artificielle énantiosélective, Distefano a introduit une phenanthroline dans ALBP (Adipocyte Lipid Binding Protein) en faisant réagir un groupement iodoacetamido-1,10-phenanthroline avec une cystéine se trouvant dans la cavité de l'ALBP. [46]La formation d'un complexe de Cu(II) permet alors la catalyse de l'hydrolyse énantiosélective d'ester d'aminoacides avec des excès énantiomériques allant jusqu'à 86% (Figure 18).

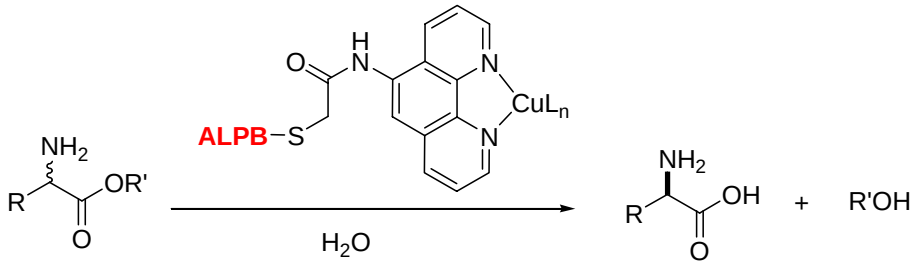


Figure 18. Résolution cinétique d'ester d'aminoacides à l'aide de Cu(II).

Les travaux de Reetz dans ce domaine on montré, d'une part, qu'il est possible d'introduire différents ligands salen et dipyridine dans la cavité de la papain (une cystéine protéase).[47] Cependant, les réactions d'époxydations et hydrogénations effectuées avec ces complexes Mn-Salen et Rh-dipyridine (Figure 19a, b) présentent une mauvaise énantiosélectivité du système (< 10% ee). Et que d'autre part, des ligands diphosphines possédant une fonctionnalité *para*-nitrophosphonate peuvent être introduits dans le site actif de différentes lipases (comportant une cystéine). Mais malheureusement cette dérivatisation est réversible.

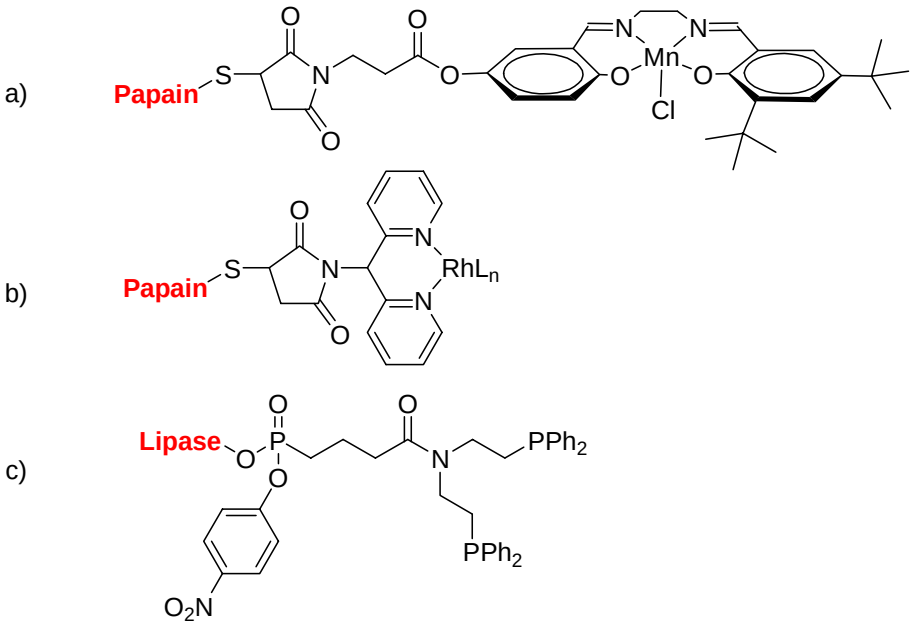


Figure 19. Incorporation covalente de ligands et de catalyseurs de métaux de transition dans des protéines.

En s'inspirant des travaux de Watanabe, Yi Lu a récemment inséré un catalyseur de type Mn-Salen de manière covalente via des ponts disulfures au sein de l'apomyoglobine mutée.[48] Ces résultats ont montré que le double ancrage du catalyseur dans la protéine mutée donne de meilleurs résultats que le système mono ancré (Figure 20) pour la sulfoxydation du thioanisole (51% en faveur du (*S*)). Ceci peut être expliqué par les multiples orientations que peut avoir le complexe dans la protéine, et qu'avec un double ancrage il est possible de contrôler la position du complexe organométallique dans la cavité de la protéine.

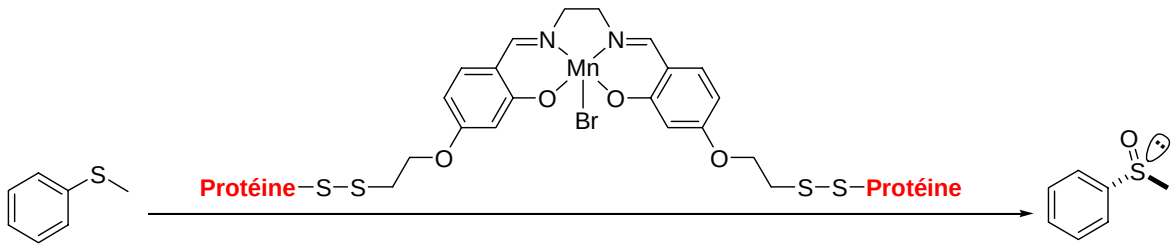


Figure 20. Sulfoxydation du thioanisole à l'aide de Mn-Salen dans l'apomyoglobine mutée.

L'introduction de catalyseurs chimiques à l'aide de liaisons covalentes dans la cavité d'une protéine semble être une approche très intéressante. Cependant, cette technique nécessite de choisir une protéine possédant un aminoacide tel qu'une cystéine, pouvant former une liaison covalente avec le complexe que l'on souhaite introduire. Ou alors d'utiliser l'optimisation génétique afin de créer ou de substituer des cystéines dans la protéine hôte. Cette technique d'ancrage nécessite plusieurs modifications, que se soit au niveau de la protéine ou du catalyseur organométallique, ce qui peu parfois être très contraignant et limitant dans le choix des métalloenzymes à tester.

5.2. Incorporation non covalente d'un catalyseur chimique dans une protéine

C'est en 1978 que Whitesides propose une approche supramoléculaire pour incorporer un catalyseur organométallique dans une protéine.[49] Il utilise pour cela le système biotine-avidine largement exploité en biologie pour la forte affinité que peut avoir l'avidine pour son inhibiteur, la biotine. En dérivatisant la biotine par un ligand diphosphine achiral, et en incorporant le complexe de rhodium correspondant dans l'avidine, il parvient à hydrogéner l'acide *N*-α-acétamidoacrylique avec un excès énantiomérique de 39 % en faveur de la forme (*S*) (Figure 21a).

Sur cette base, Chan a proposé un système similaire pour l'hydrogénation de l'acide itaconique en introduisant un complexe chiral Rh-pyrphos dans l'avidine.[50] Ces resultats ont montré que l'hydrogénation asymétrique de l'acide itaconique est significativement influencée par la présence de la protéine (Figure 21b). En sachant que le (*S*,*S*)-pyrphos produit dans ce système l'énantiomère (*R*) de l'acide methylsuccinique avec 48% ee, il est possible en modifiant la température (de 22°C à 40°C) de changer la configuration absolue du produit majoritaire en passant de 48% (*R*) à 20% (*S*).

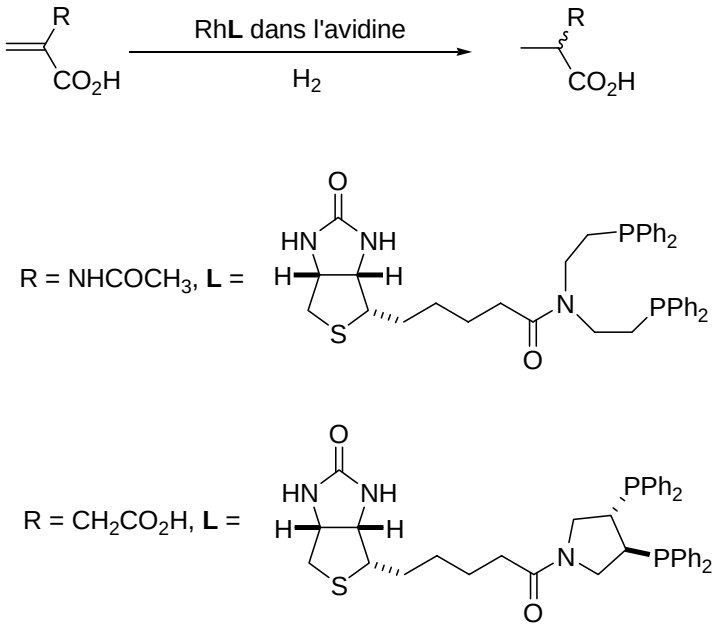


Figure 21. Hydrogénation d'une oléfine prochirale à l'aide de complexes de rhodium en présence d'avidine.

En 2003, Watanabe décrit l'introduction d'un complexe achiral de Mn(III) dans le site actif de l'apomyoglobine mutante.[51] Une fois le complexe de 3-3'-X_2-salen-Mn(III) (Figure 22) introduit dans la cavité de la protéine, le métal se coordonne avec His93. Cette métalloenzyme semisynthétique est alors utilisée pour la sulfoxydation du thioanisole utilisant H_2O_2 comme oxydant. Ses récents résultats montrent que l'énantiosélectivité de la catalyse dans la cavité protéique peut être régulée par les positions du métal et du substrat. Ainsi en remplacent sur le ligand salen les groupements en position 3 et 3' (X = Me, *n*-Pr), il est possible de varier l'excès énantiomérique de respectivement 33% (*S*) à 17% (*R*).[52]

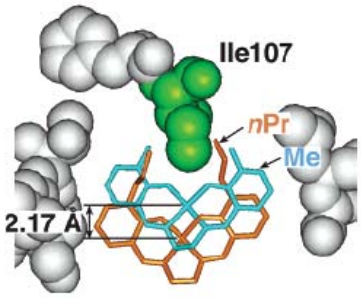


Figure 22. Complexe de Salen-Mn(III) dans l'apomyoglobine mutante.[52]

De plus, Watanabe a récemment décrit l'insertion de Pd[0] dans la cavité de la ferritine, une protéine de stockage du fer constituée de l'assemblage de 24 sous-unités délimitant une cavité centrale d'un diamètre de 80 Å. Grâce à ce système, il est alors possible d'hydrogéner sélectivement des oléfines de différentes tailles en phase aqueuse.[53]

D'autre part, les travaux de Marchetti montrent qu'en présence de catalyseur de rhodium dans la sérum albumine humaine, il est possible d'effectuer l'hydroformylation du styrène, en conditions biphasiques, avec de bon rendements et une bonne régiosélectivité. Cependant, avec ce système il reste difficile de définir la position du catalyseur dans cette protéine.[54] De plus, dans ces recents travaux Gross utilise différentes sérum albumines avec des complexes de corroles, pour la sulfoxydation du thioanisole en présence de peroxyde d'hydrogène. Ainsi avec ces systèmes il est possible d'obtenir jusqu'à 74 % ee (*S*) avec la BSA (16 % de conversion) et 65 % ee (*S*) avec PSA (98 % de conversion).[55]

L'insertion non covalente d'un catalyseur chimique dans une protéine est une méthode beaucoup plus simple et plus rapide pour la création de métalloenzymes artificielles. Cette

approche ne nécessite aucune étape de synthèse par rapport à un ancrage covalent, permettant ainsi d'apporter des variations au niveau de la protéine hôte mais aussi au niveau du catalyseur organométallique afin de tester les différentes combinaisons de ligands et de protéines. Cependant, l'étape déterminante réside dans le choix du système Ligand ⊂ protéine, puisqu'il est nécessaire de s'assurer que le catalyseur est localisé dans la cavité de protéine au cours de la réaction. Le système biotine ⊂ avidine (velcro moléculaire) utilisé par Whitesides pour l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique, semble être un système de choix.

6. Système Biotine ⊂ (Strept)Avidine

6.1. La Biotine

La biotine, appelée aussi vitamine H ou B_8 (Figure 23), est une vitamine hydrosoluble constituée d'un noyau imidazolidone et d'un cycle tétrahydrothiophène porteur d'une chaîne latérale à cinq atomes de carbone.[56] La biotine se fixe avec une très grande affinité à l'avidine (quasi-irréversible), glycoprotéine que l'on trouve dans le blanc d'oeuf.

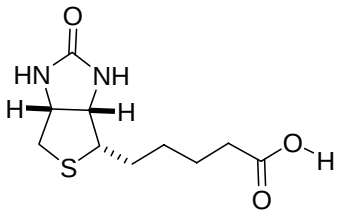


Figure 23. Biotine.

La biotine est le coenzyme des carboxylases qui catalysent l'addition d'un groupe CO_2 à différents substrats. La biotine liée à l'enzyme, fixe sur l'azote de son noyau imidazolidone un groupe CO_2 qu'elle cède ensuite aux substrats.[57-59]

La biotine joue un rôle clef dans le métabolisme des protéines, des graisses et des glucides. Les carences sont très rares chez l'adulte, elles se remarquent principalement au cours d'une alimentation riche en avidine (blanc d'oeuf), car son action est inhibée une fois qu'elle se lie à cette protéine.[60]

6.2. La technologie Biotine-(Strept)Avidine

La forte affinité de la biotine pour l'avidine et son homologue bactérien, la streptavidine, a été exploitée durant ces dernières années dans différentes applications biomédicales[61,62], biochimique[63,64], immunologiques[65], nanotechnologiques[66] et chimiques.[49,50]

Avec des K_a de l'ordre de 10^{15} M^{-1} pour le système Biotine $\subset$ Avidine, et de 10^{13} M^{-1} pour le système Biotine $\subset$ Streptavidine, ces interations non-covalentes sont parmis les plus fortes connues entre un ligand et une protéine (Tableau 2).[67] Par ailleurs, cette affinité ne diminue pas de manière significative lorsque l'on dérivatise la fonction carbonyle de la biotine.[68]

Système	Constante d'affinité (Ka, M^{-1})
Biotine $\subset$ Avidine	$1.7\ 10^{15}$
Biotine $\subset$ Streptavidine	$2.5\ 10^{13}$
Inhibiteur $\subset$ Protéase	10^{10}-10^{13}
Ligand $\subset$ Récepteur	10^{9}-10^{12}
Antigène $\subset$ Anticorps	10^{7}-10^{11}
Sucre $\subset$ Lectine	10^{3}-10^{6}
Substrat $\subset$ Enzyme	10^{3}-10^{5}

Tableau 2. Constantes d'affinité de complexes Ligand $\subset$ Protéine présents dans la nature.

6.3. Strepavidine et Avidine

6.3.1. Avidine

L'avidine est une glycoprotéine tétramérique d'environ 62400 Da (4 x 128 aminoacides), chaque monomère est capable de fixer une molécule de biotine (Figure 24). Cette protéine est présente dans le blanc d'oeuf et l'oviducte des oiseaux, des reptiles et des amphibiens, mais totalement absente chez les mammifères.[60,69]

L'avidine est riche en résidus lysine et arginine qui lui confèrent un point isoélectrique élevé de l'ordre de 10.4. Chaque monomère comporte un pont disulfure entre les deux seules cystéines de la séquence. L'avidine est *N*-glycosylée sur l'asparagine 17, la chaîne saccharidique est constituée d'environs 4 résidus mannose et de trois résidus N-glucosamine, elle représente environ 10 % de la masse molaire de la protéine. Son rôle est assez mal connu, mais elle n'intervient pas dans l'interaction biotine-avidine.[60,70,71]

Cette protéine est stable à des températures élevées, jusqu'à 85°C en absence de biotine et 132°C avec la biotine, elle supporte aussi des pH allant de 2 à 13. En cas de dénaturation, elle peut être renaturée en présence de biotine.[60,70]

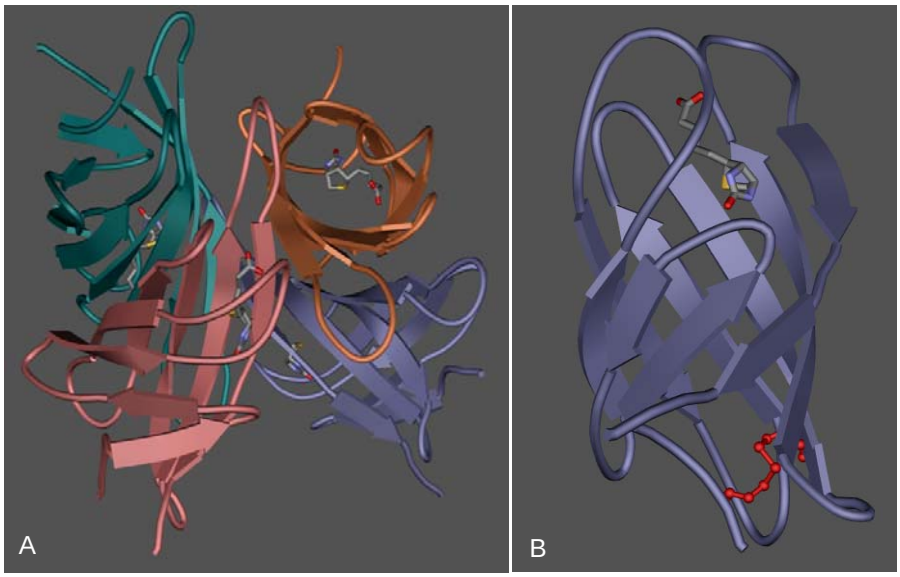


Figure 24. Structure de l'avidine. **A**. Tétramère en présence de biotine. **B**. Monomère en présence de biotine avec pont disulfure représenté en rouge.

Ce tétramère est organisé en dimère de dimère selon une symétrie 222 (interactions monomère-monomère 1-2 et 3-4). Chaque sous-unité est constituée de 8 brins β antiparallèles avec une torsion hélicoïdale de type main droite, reliés entre eux par des loops. La forme générale des monomères est celle d'un « tonneau β » (β-barrel) dont la cavité est hydrophobe (Figure 24).[72-74] Bon nombre d'interactions polaires ou de type Van der Waals stabilisent les interactions monomère – monomère.[75]

6.3.2. Streptavidine

La streptavidine est une protéine tétramérique , l'équivalent bactérien de l'avidine, produite naturellement par *Streptomyces avidinii*, elle est capable de fixer 4 molécules de biotine avec une affinité de 10^{13} M^{-1}.[67] Sa masse molaire est d'environ 65 000 Da et son point isoélectrique est de 6,4.

Contrairement à l'avidine, la streptavidine est une protéine non glycosylée et sans aucun pont disulfure.[67,76] Elle est relativement stable dans des conditions drastiques (hautes températures, pH extrêmes, chlorure de guanidium) et la présence de biotine renforce cette stabilité.[77]

La séquence protéique de la streptavidine présente 30 % d'identité (41 % d'homologie) avec celle de l'avidine. Six zones présentent une identité de 64 % (74 % d'homologie) et correspondent la majorité du temps aux motifs structuraux conservés entre les deux protéines. Sur le reste de la séquence, on ne note que 7 % d'identité et 17 % d'homologie (Figure 25).[72]

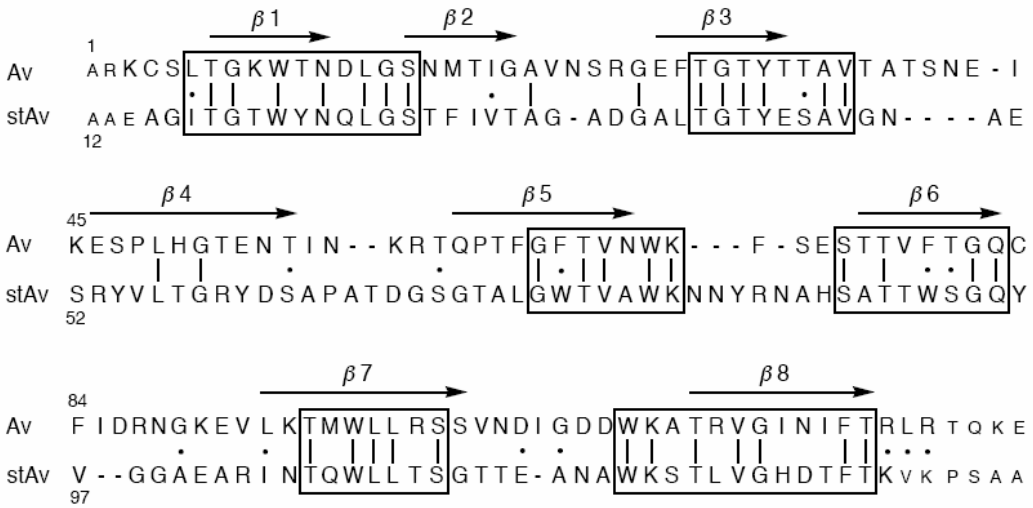


Figure 25. Alignement des séquences protéiques de l'avidine (Av) et de la streptavidine (Sav). Les séquences hautement homologues sont encadrées, les résidus communs aux deux séquences sont signalés par un trait, les résidus homologues sont signalés par un point.

Si l'on superpose les monomères de la streptavidine et de l'avidine on observe que les différences structurales majeures résident au niveau des loops reliant les brins β (Figure 26). On remarque que le loop 5,6 (qui relie les brins β5 et β6) de la streptavidine est plus grand et présente une structure secondaire par rapport à celui de l'avidine. Alors que loop 3,4 (qui relie les brins β3 et β4) est plus court dans la streptavidine que dans l'avidine.

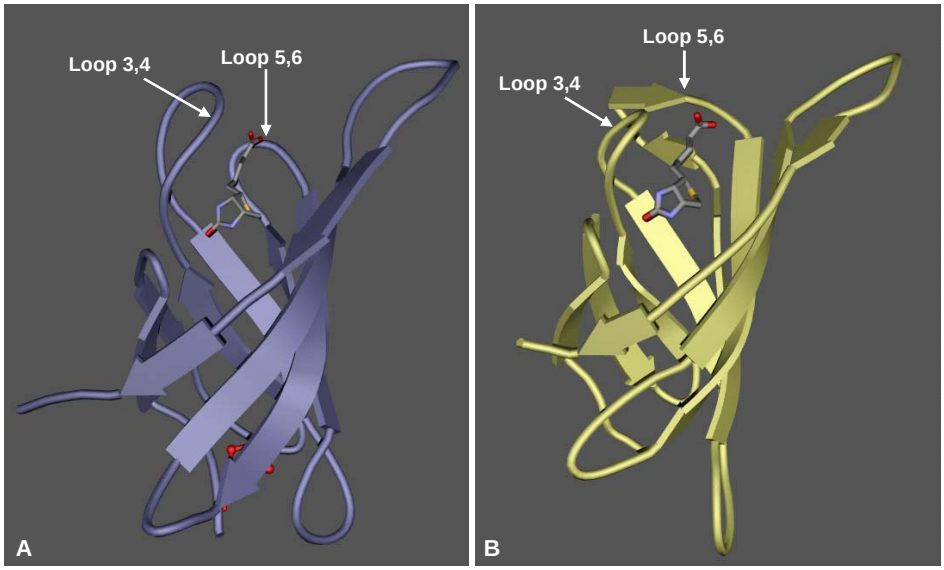


Figure 26. Représentation d'un monomère de l'Avidine (A) et de la Streptavidine (B).

6.4. Interactions Biotine-(Strept)Avidine

Les structures tridimensionnelles de l'avidine[72-74,78,79] et de la streptavidine[80,81] ont permis de comparer leurs différentes interactions avec la biotine et les protéines. Il existe deux types d'interactions entre la biotine et la (Strept)avidine : i) interactions hydrophobes, ii) liaisons hydrogènes.

Les interactions hydrophobes font intervenir les résidus aromatiques (Trp-70, Phe-72, Phe-79 et Trp-97 dans le cas de l'avidine et Trp-79, Trp-92 et Trp-108 pour la streptavidine) des protéines avec le cycle tetrahydrothiophène et les chaînes aliphatiques de la biotine (Figure 27). De plus, le Tryptophane 110 de l'avidine ou 120 de la streptavidine provenant d'un monomère adjacent interagissent avec la biotine.[73,75,82-84]

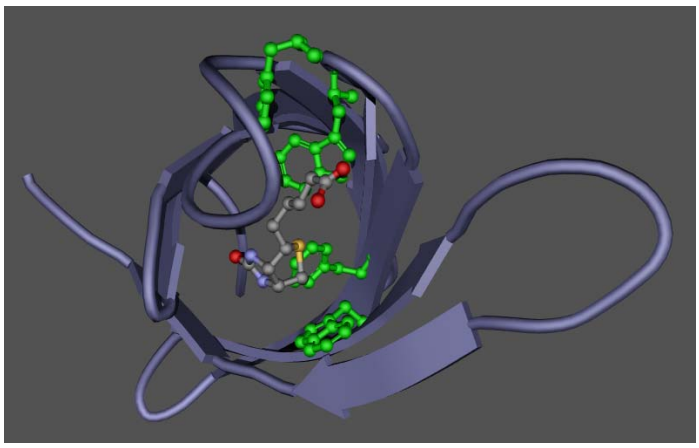


Figure 27. Interactions hydrophobes Trp-70, Phe-72, Phe-79 et Trp-97 dans le cas du monomère de l'avidine.

Les liaisons hydrogènes dans la streptavidine concernent principalement le cycle uréidique de la biotine alors que dans l'avidine, elles impliquent aussi le groupement carbonyle de la biotine (Figure 28).[73,85,86] Ces interactions font intervenir des aminoacides des loop 1,2 et 3,4.[72,74,85,87] D'autre part, on observe grâce à ces liaisons hydrogènes un repliement de loop 3,4 (résidus 35-46 pour l'avidine et 45-52 pour la streptavidine) sur l'acide valérique de la biotine bloquant ainsi l'accès du site actif.[88,89]

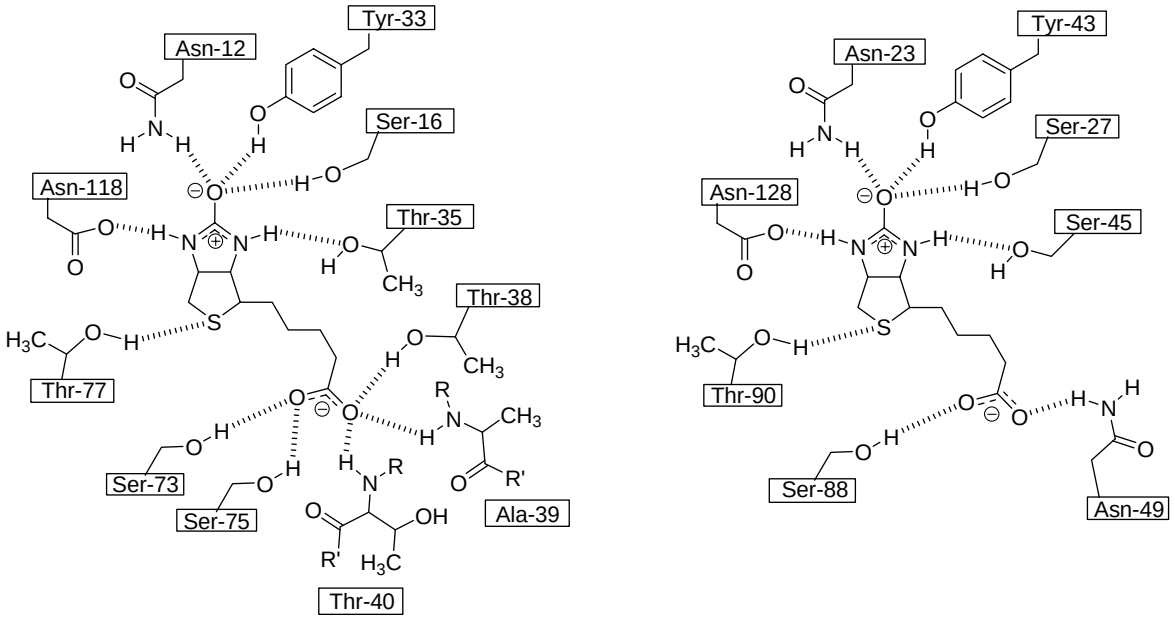


Figure 28. Représentation des liaisons hydrogènes existantes dans l'avidine et la streptavidine.

On peut donc observer que la fonction urée du cycle tetrahydrothiophène de la biotine contribue fortement à la stabilité du système. D'autre part, même si le groupement carboxylique de la biotine participe dans diverses interactions, sa dérivatisation a une faible incidence sur l'affinité des complexe biotine-(strept)avidine.[90]

7. Objectifs de la thèse

Le but de ce travail de thèse a été d'exploiter la technologie biotine-(strept)avidine afin d'introduire un catalyseur organométallique de manière non covalente dans une protéine. Ces métalloenzymes artificielles sont testées pour l'hydrogénation asymétrique d'oléfines prochirales en présence de complexe de rhodium.

La dérivatisation de la biotine par un ligand diphosphine achiral, permet de créer un catalyseur actif en hydrogénation mais non sélectif en absence de protéine. Cette approche permet de mettre en évidence l'influence de la seconde sphère de coordination, et ainsi de dissocier l'activité de la sélectivité de ce catalyseur hybride.

Ces métalloenzymes artificielles ont été testées pour l'hydrogénation énantiosélective de l'acide *N*-α–acétamidoacrylique et de l'acide *N*-α–acétamidocinnamique. L'optimisation chimique et génétique a permis d'améliorer l'énantiosélectivité de ces catalyseurs (Figure 29).

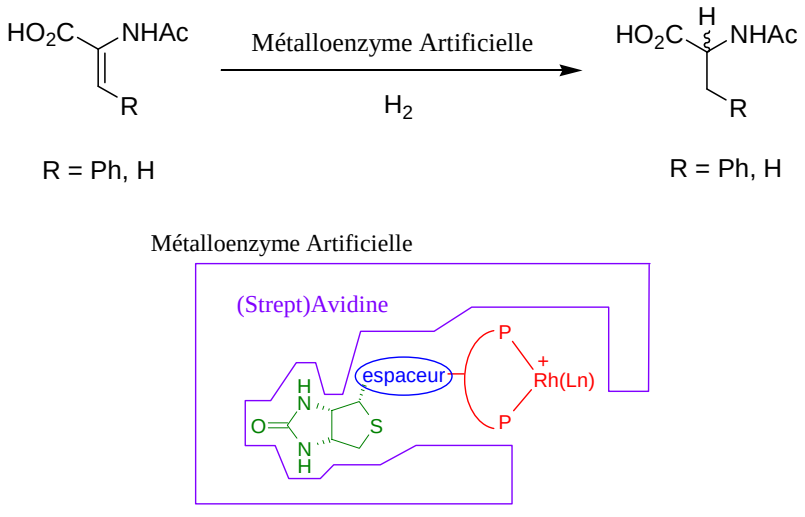


Figure 29. Métalloenzymes artificielles pour l'hydrogénation énantiosélective de l'acide α–acétamidoacrylique. La protéine (violet) possède une forte affinité pour la biotine (vert).

L’introduction d’un espaceur (bleu) et la variation du ligand diphosphine (rouge) conduit à une optimization chimique de l’énantiosélectivité.

L’optimisation chimique a consisté d’une part à tester deux types de ligands diphosphines, et d’autre part à introduire différents espaceurs chiraux et achiraux entre la biotine et le groupement diphosphine par le biais d’acides aminés aliphatiques et aromatiques, permettant ainsi de faire varier la position du ligand bidenté dans la cavité de la protéine et de trouver le meilleur environnement pour une bonne énantiosélectivité.

L’optimisation génétique a quant à elle permis de tester différents mutants de la streptavidine et de l’avidine avec ces complexes biotinylés. Cette démarche a pour but, d’essayer de mettre en évidence les régions de l’avidine et la streptavidine pouvant influencer l’énantiosélectivité de la réaction.

De plus, l’étude de l’influence du pH, de la température, de la quantité et de la nature de solvant organique ainsi que la détermination de constantes de vitesse de la catalyse permettent de mieux comprendre l’action de cette métalloenzyme artificielle pour l’hydrogénation asymétrique d’oléfines prochirales.

VI. Résultats et discussion

1. Préambule

Afin d'élaborer des métalloenzymes artificielles basées sur la technologie biotine-(strept)avidine, nous nous sommes intéressé à créer de manière chimique une petite bibliothèque de ligands biotinylés pouvant être testés pour l'hydrogénation énantiosélective d'oléfines prochirales. Pour cela, deux types de ligands diphosphines biotinylés ont été préparés, puis différents espaceurs ont été introduits entre la biotine et la diphosphine à l'aide de couplages peptidiques (Figure 30). Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Julieta Gradinaru et le Dr. Jérôme Collot.

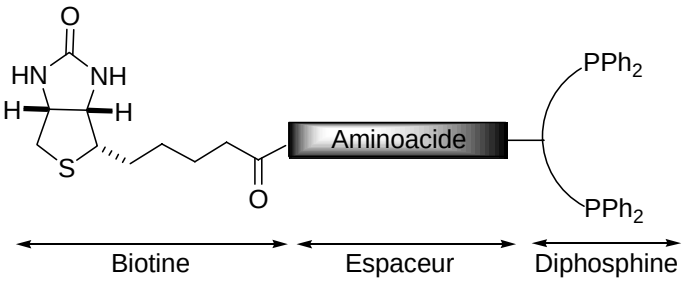


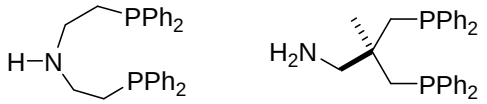
Figure 30. Représentation schématique des ligands biotinylés.

D'autre part, des modifications au niveau des protéines Wild Type (avidine et streptavidine) ont été réalisées au sein de notre laboratoire. Cette optimisation génétique a été effectuée par le Dr. Nicolas Humbert, Dr. Andrea Zocchi, Melle Anita Ivanova.

2. Optimisation chimique

2.1. Ligands biotinylés sans espaceur

Deux types de ligands diphosphines ont été testés pour cette étude (Figure 31) ; l'aminodiphosphine **1** dont le squelette flexible forme un cycle à 8 chaînons lorsqu'il est lié au métal, et qui contient une amine secondaire endocyclique[49], et l'aminodiphosphine **2** dont le squelette plus rigide forme un cycle à 6 avec le métal et qui contient une amine primaire exocyclique[91].



H-**1** H-**2**

Figure 31. Ligands diphosphines.

Le couplage de H–**1** et H–**2** avec la biotine *N*-hydroxysuccinimide[92] (**Biot**NHS) a permis de synthétiser les deux ligands biotinylés **Biot–1**[93] et **Biot–2** avec respectivement des rendements de 67 % et 69 % (Figure 32).

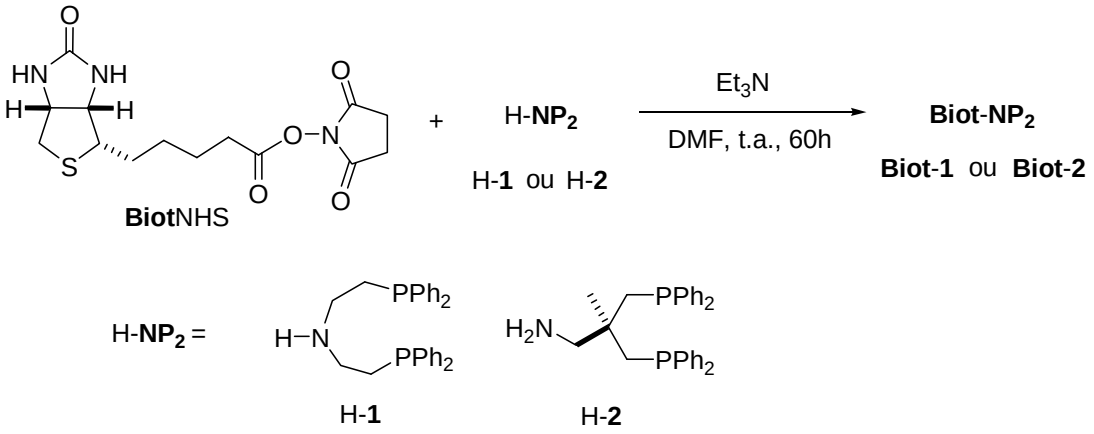


Figure 32. Synthèse de **Biot–1** et de **Biot-2**.

2.2. Ligands biotinylés avec espaceurs non chiraux

Deux types d'aminoacides achiraux ont été introduits comme espaceurs entre la biotine et les groupements diphosphines **1** et **2** (Figure 33) : des aminoacides aliphatiques $\mathbf{3^n}$ (n = 1-5) et des aminoacides aromatiques $\mathbf{4^q}$ (q = *ortho*-, *meta*- et *para*-). Grâce à cette démarche il est possible de varier la position du groupement diphosphine dans la cavité de la protéine, en vue de trouver l'environnement chiral le plus propice pour l'hydrogénation énantiosélective d'oléfines prochirales.

Etant donné que les aminoacides que nous souhaitons introduire ne sont pas chiraux, il n'existe pas de risque de racémisation par cyclisation intramoléculaire au cours du couplage. Nous avons donc choisi d'effectuer le couplage dans le sens C→N[94], permettant ainsi d'introduire le motif diphosphine sensible à l'oxydation lors de la dernière étape de la synthèse.

Dans un premier temps, la biotine est couplée avec les aminoacides non protégés en utilisant isobutylchloroformate comme agent d'activation (Figure 33).[95] Le mélange réactionnel

d'aminoacide biotinylé est ensuite acidifié, puis mis cristalliser dans un mélange EtOH : H_2O (1 : 1) ; les rendements obtenus varient entre 53 - 81% selon l'aminoacide utilisé.

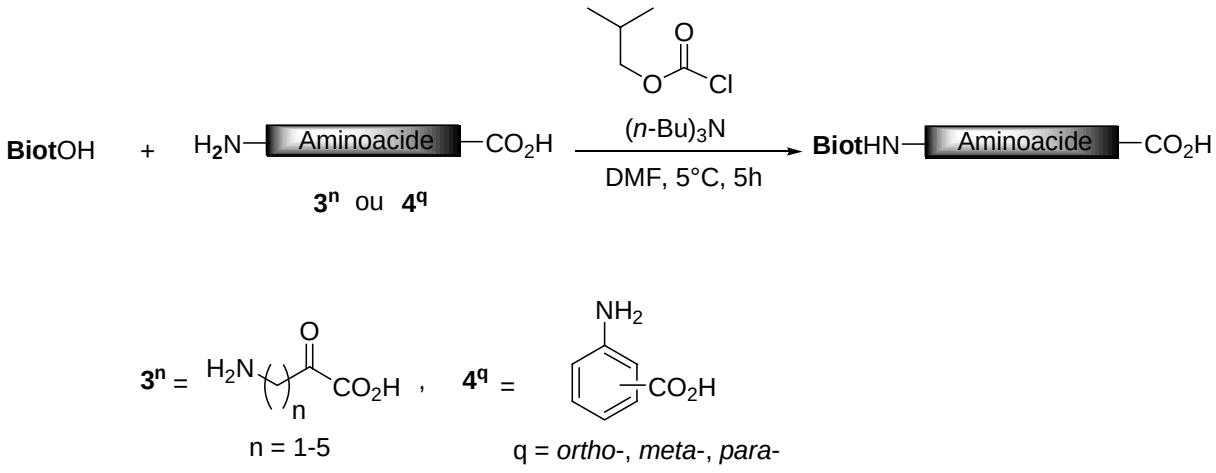


Figure 33. Couplage de différents espaceurs achiraux avec la biotine.

Le couplage de **Biot–3^n** et **Biot–4^q** avec les unités aminodiphosphines H–**1** et H–**2** est réalisé à l'aide du 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine[96] (CDMT) comme agent d'activation dans de l'acétonitrile anhydre (Figure 34). Une chromatographie sous atmosphère inerte permet d'isoler le produit pur avec des rendements de 29 - 64 % pour **Biot–3^n–1** (n = 1 – 5), de 29 % et 61 % pour **Biot–4^q–1** (q = *meta-*, *para-*), de 20 - 50 % pour **Biot–3^n–2** (n = 1 – 5) et pour **Biot–4^q–2** (q = *ortho-*, *meta-*, *para-*) de 21 - 24 %.

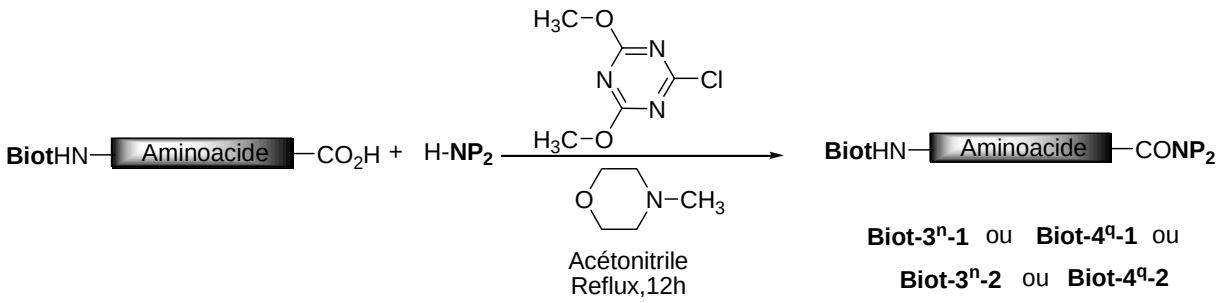


Figure 34. Synthèse des 18 ligands biotinylés avec espaceurs non chiraux.

Cependant, dans le cas du couplage de **Biot–4**^{ortho} avec l'aminodiphosphine H-**1** nous avons obtenu le ligand **Biot–4**^{ortho}**–1** contaminé avec **Biot–1**. Malgré toute attente nous n'avons pas réussi à séparer ces deux produits par chromatographie et par recristallisation.

La formation de **Biot–1** au cours du couplage peptidique C→N peut s'expliquer par la formation au cours de la réaction d'une benzoxazinone à partir de l'acide activé de **Biot–4**^{ortho}. L'attaque nucléophile de H-**1** peut ensuite se faire à deux niveaux ; soit sur le carbonyle pour générer **Biot–4**^{ortho}**–1**, ou alors sur le groupement C=N pour donner après hydrolyse le ligand **Biot–1** et l'acide anthranilique **4**^{ortho} (Figure 35).

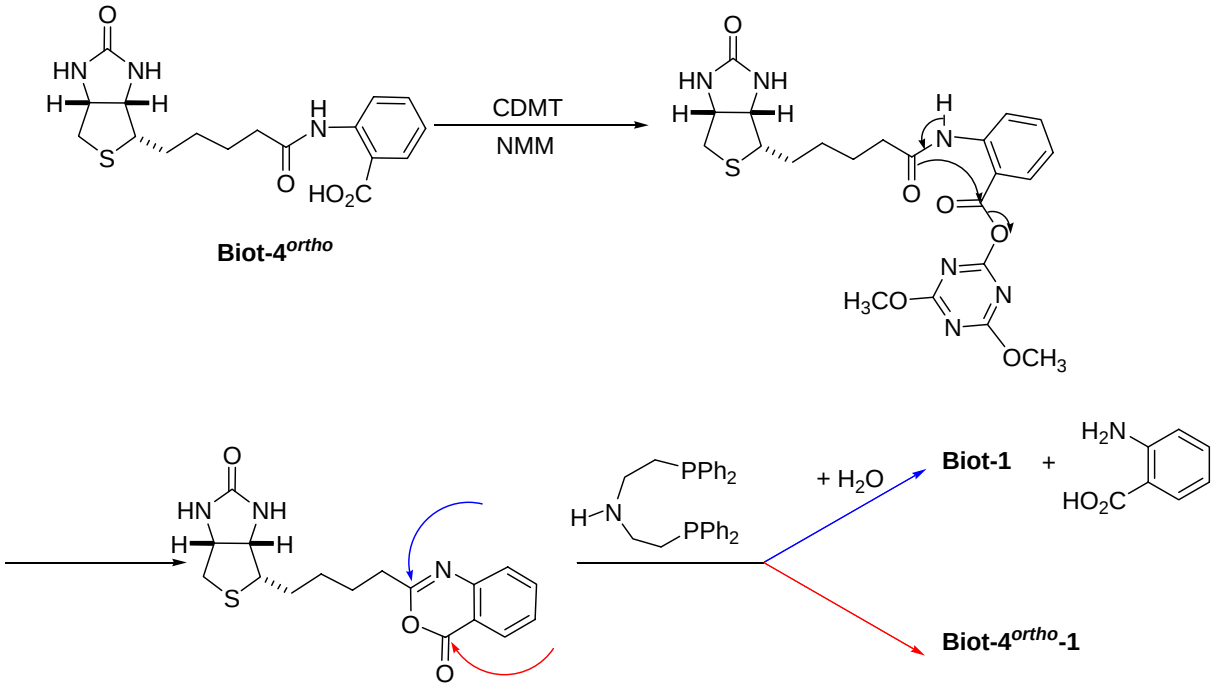


Figure 35. Mécanisme envisagé pour la contamination du ligand **Biot–4^{ortho}–1** avec **Biot–1**.

Afin de contourner ce problème, nous avons choisi d'utiliser la méthode inverse de couplage N→C, évitant ainsi de passer par un intermédiaire benzoxazinone. Le couplage de la diphosphine H-**1** avec l'acide anthranilique **4**^{ortho} en présence de CDMT, permet d'obtenir le produit **4**^{ortho}**–1** qui est isolé par chromatographie avec un rendement de 49 %. Le couplage à la biotine est réalisé par la suite, à l'aide de CDMT et permet d'obtenir le produit **Biot–4**^{ortho}**–1** pur après chromatographie avec un rendement de 43 % (Figure 36).

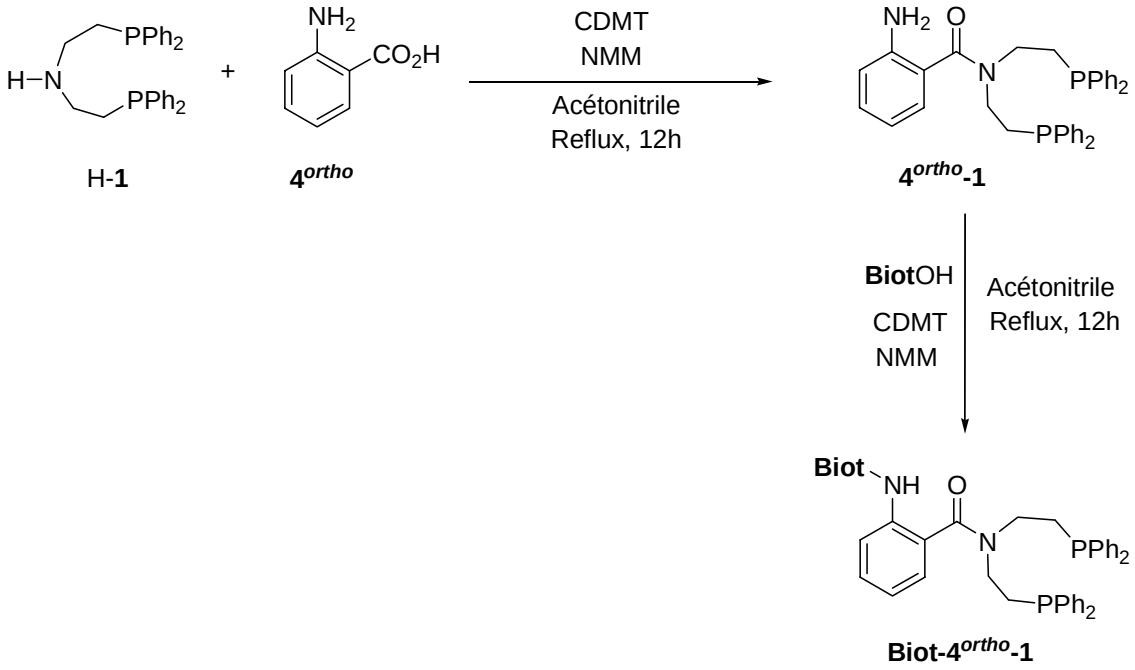


Figure 36. Méthode inverse de couplage pour la préparation de **Biot–4^{ortho}–1**.

2.3. Ligands biotinylés avec espaceurs chiraux

L'introduction d'espaceurs chiraux permet de créer des ligands biotinylés possédant une même structure de base tout en ayant un positionnement différent dans la protéine. Cette approche complémentaire donne la possibilité de comparer pour un même ligand l'influence de son environnement chiral sur l'énantiosélectivité de la catalyse.

Deux aminoacides chiraux ont été introduits comme espaceurs entre la biotine et les groupements diphosphines **1** et **2** : la phénylalanine (**(*R*)-Phe** et **(*S*)-Phe**) et la proline (**(*R*)-Pro** et **(*S*)-Pro**). Ces deux α-aminoacides ont été choisis pour les caractéristiques de leurs chaînes latérales. La phénylalanine (**Phe**) possède un groupement phényle encombrant et capable de créer des interactions hydrophobes avec les aminoacides aromatiques de la poche protéique. La proline

(**Pro**) quant à elle, est un aminoacide de structure cyclique avec une amine secondaire connue pour sa capacité de rigidifier les structures peptidiques.

Afin d'éviter les risques de racémisation au cours de la synthèse, nous avons choisi d'effectuer le couplage dans le sens N→C. Nous évitons ainsi la possibilité de former dans des conditions basiques une oxazolone à partir de l'acide activé et par conséquent, de racémiser (Figure 37).[94]

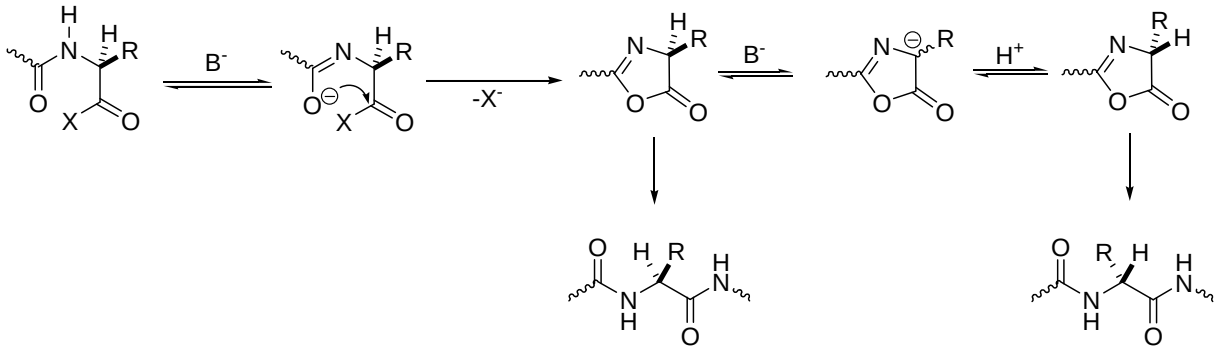


Figure 37. Mécanisme de racémisation par formation d'oxazolone.

Dans un premier temps, les aminoacides *N*-protégés par un groupement *t*-butoxycarbonyle (**Boc-(*R*)-Phe**, **Boc-(*S*)-Phe**, **Boc-(*R*)-Pro** et **Boc-(*S*)-Pro**) sont couplés avec les ligands aminodiphosphine H–**1** et H–**2**. Le couplage est réalisé à l'aide du 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine[96] (CDMT) comme agent d'activation dans de l'acétonitrile anhydre (Figure 38). Une chromatographie sous atmosphère inerte permet par la suite d'isoler le produit pur avec des rendements de l'ordre de 60% pour **Boc-(*R*)-Phe-1** et **Boc-(*S*)-Phe-1** et de 70% pour **Boc-(*R*)-Pro-1** et **Boc-(*S*)-Pro-1**, et de 20%-30% pour **Boc-(*R*)-Phe-2**, **Boc-(*S*)-Phe-2, Boc-(*R*)-Pro-2** et **Boc-(*S*)-Pro-2**.

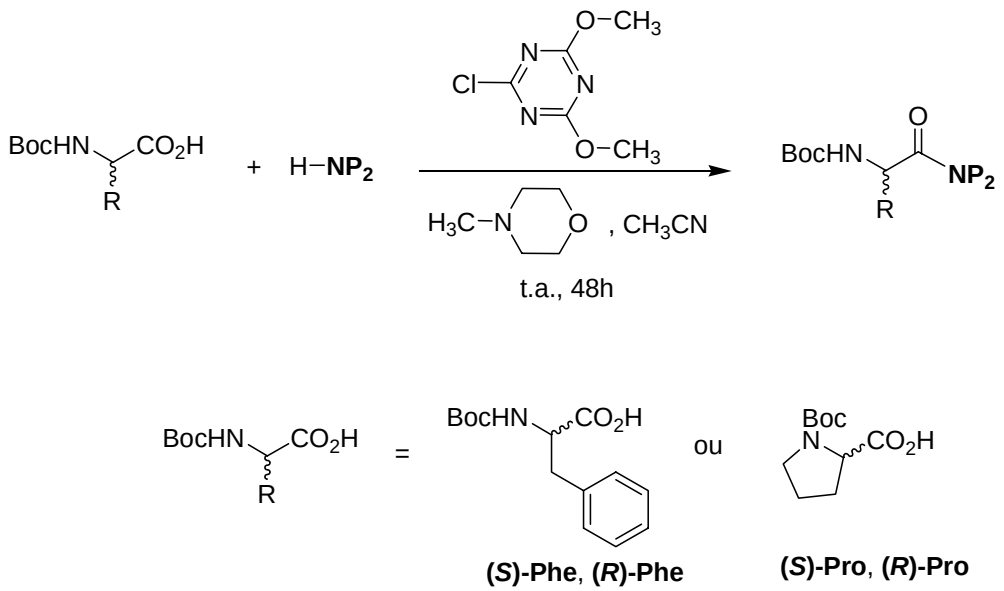


Figure 38. Couplage des espaceurs chiraux avec les ligands diphosphines **1** et **2**.

La déprotection de l'amine se fait par la suite en présence d'un excès d'acide trifluoroacétique (TFA) et d'anisole.[97] L'addition de ce dernier au milieu réactionnel permet de piéger les carbocations *tert*-butyliques, formés au cours de la réaction, susceptibles de conduire à des substitutions électrophiles au niveau des groupements phényles de la diphosphine. Le mélange réactionnel est ensuite évaporé et séché sous vide afin d'éliminer l'excès de TFA et utilisé pour le couplage avec l'ester pentafluorophénolique de la biotine[98] (**BiotOC$_6$F$_5$**) (Figure 39). Le produit désiré est purifié par chromatographie (SiO_2) sous atmosphère inerte et obtenu avec des rendements pour **Biot-Phe-1** ((*S*) et (*R*)) de 34 et 40 %, pour **Biot-Pro-1** ((*S*) et (*R*)) de 54% et 58 %, pour **Biot-Phe-2** ((*S*) et (*R*)) de 58% et 47 % et pour **Biot-Pro-2** ((*S*) et (*R*)) de 38% et 24%.

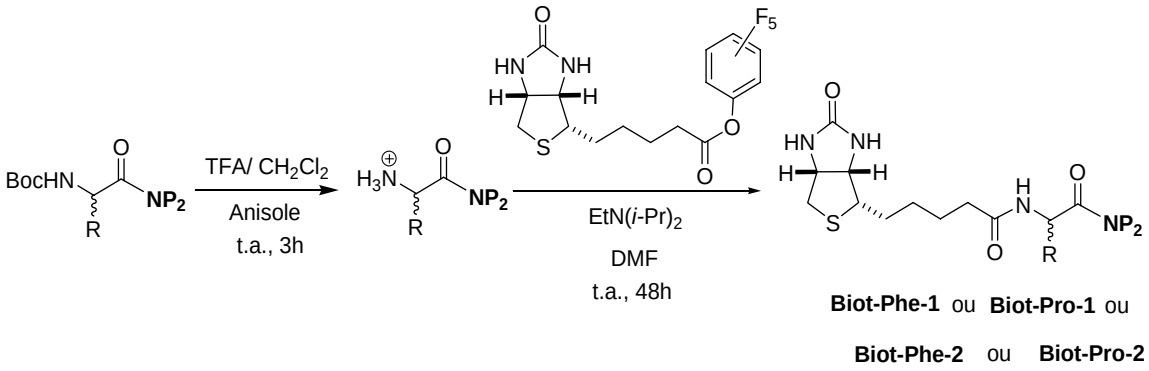


Figure 39. Étape de déprotection et de couplage avec **BiotOC$_6$F$_5$** pour la préparation des 8 ligands biotinylés avec espaceurs chiraux.

2.4. Autres ligands biotinylés

Afin de tester un troisième type de ligand diphosphine, nous avons essayé d'introduire l'aminodiphosphine **6** au niveau de la biotine (Figure 40). Ce nouveau ligand se caractérise par un squelette rigide capable de former un cycle à 8 chaînons lorsqu'il est lié au métal, comme dans le cas du ligand **1**.

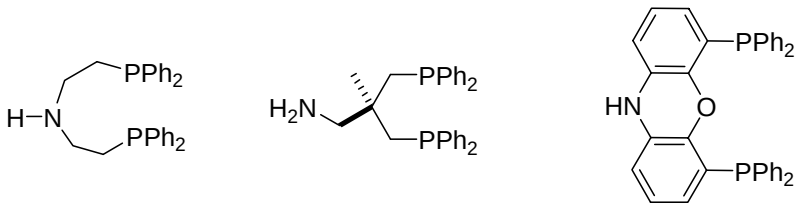


Figure 40. Ligands diphosphines.

Pour la synthèse du ligand biotinylé **Biot–6**, nous avons tenté dans un premier temps des méthodes de couplages peptidiques traditionnels, comme l'activation de la biotine par l'isobutylchloroformate[95] ou le BOP[94] en présence d'amines tertiaires comme base. Malheureusement, ces deux approches se sont révélées inefficaces.

Il nous a donc semblé qu'il était nécessaire de former l'amidure de sodium à partir de H-**6** [99] pour obtenir un composé beaucoup plus réactif. Mais là encore, la déprotonation de l'amine de H-**6** en présence de d'hydrure de sodium, puis le couplage avec l'ester pentafluorophénolique de la biotine [98] (**BiotOC$_6$F$_5$**) n'a pas permis d'obtenir le produit désiré (Figure 41).

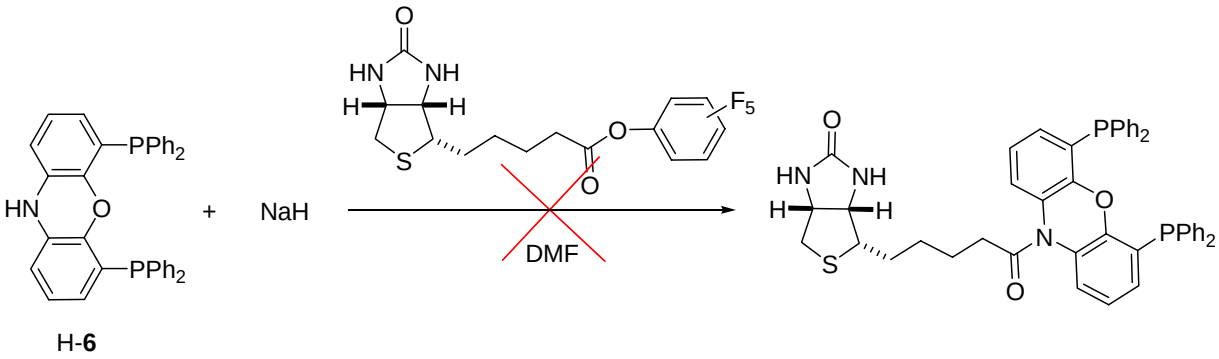


Figure 41. Tentative de couplage de **6** avec **BiotOC$_6$F$_5$**.

On peut penser que le facteur empêchant la formation de **Biot-6** au cours cette réaction est la réactivité de l'urée de la biotine. En effet, il est probable qu'en utilisant l'hydrure de sodium en légers excès, la fonction urée soit déprotonée (soit grâce à l'hydrure de sodium ou par l'amidure de sodium généré). Cette déprotonation peut ensuite conduire à des réactions de couplage biotine-biotine ou encore à des réactions intramoléculaires au niveau de la biotine, ce qui par conséquent empêcherait le couplage avec le ligand **6**.

Afin de contourner ce problème, nous avons envisagé de protéger les groupements NH de la biotine avec l'allyloxycarbonyl (**Alloc**).[100] Ce groupement protecteur étant stable en conditions basiques et acides, on peut sans aucun problème introduire une protection acido-labile au niveau de la fonction acide de la biotine avant de protéger l'urée, et effectuer par la suite nos couplages en conditions basiques.

Ainsi après avoir fait directement réagir la biotine dans du diméthylformamide di-*tert*-butyl acétal nous obtenons l'ester *tert*-butylique de la biotine (**BiotO*t*-Bu**) sur lequel nous introduisons successivement deux groupements **Alloc** sur chaque azote de l'urée (Figure 42). Une première protection **Alloc** est introduite après la déprotonation du groupement NH avec un équivalent d'hydrure de sodium à température ambiante, puis après réaction avec un équivalent d'allyl *p*-nitrophenyl carbonate. Par la suite la déprotonation et l'introduction d'une seconde protection **Alloc** est plus difficile et nécessite de chauffer le mélange réactionnel. Cette seconde étape de la réaction suggère qu'à l'avenir on pourrait se contenter d'introduire une seul protection **Alloc** sur l'urée, puisque l'hydrogène du groupement NH d'une urée mono-**Alloc** est beaucoup moins acide, donc moins réactive.[101]

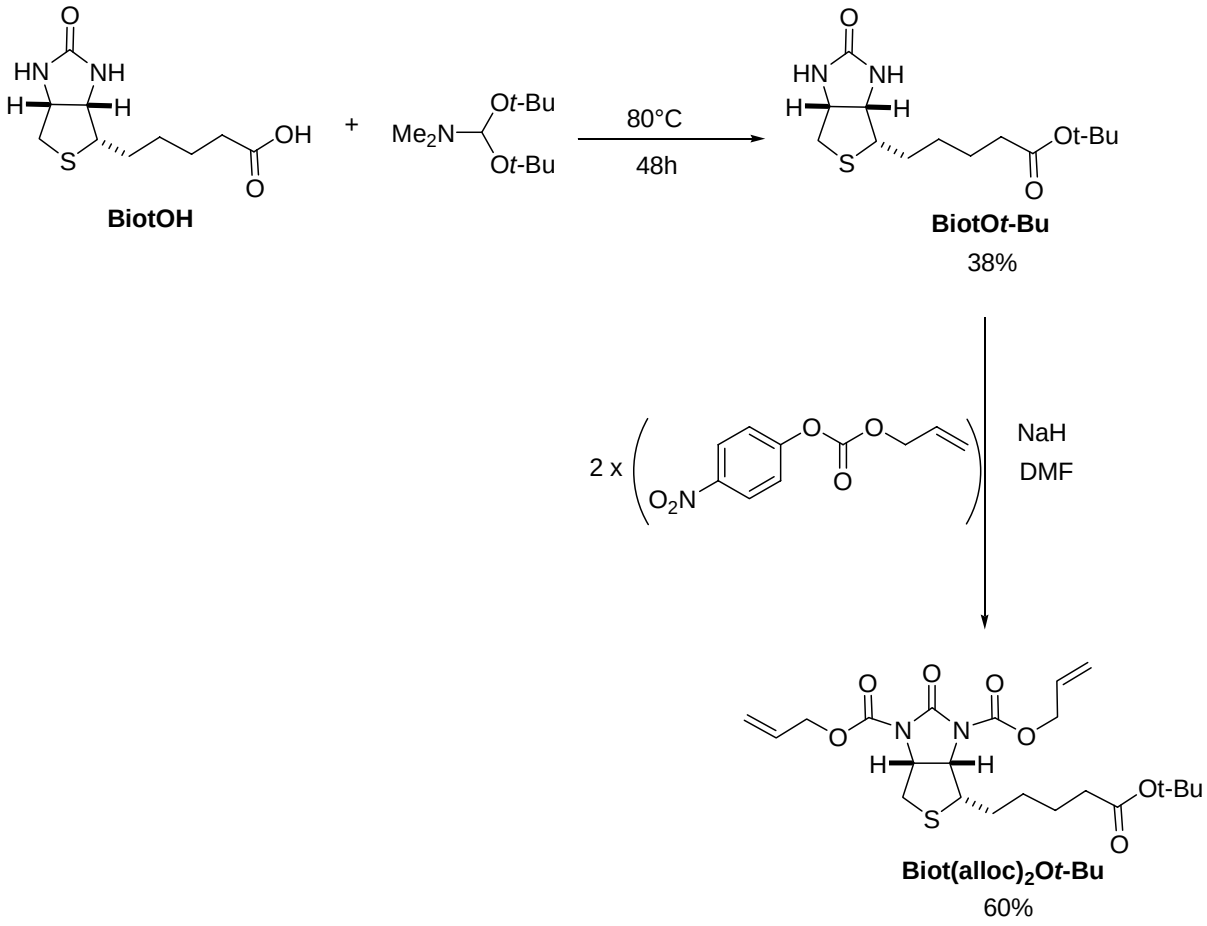


Figure 42. Introduction de protections **Alloc** sur l'urée de la biotine.

La libération de la fonction acide de **Biot(alloc)$_2$O*t*-Bu** se fait en présence d'un excès de TFA. La **Biot(alloc)$_2$OH** est ensuite activée par un groupement pentafluorophényl ester afin de permettre l'addition du ligand **6**. Dans ces conditions après déprotonation de H-**6** en présence de d'hydrure de sodium on obtient le produit de couplage **Biot(alloc)$_2$-6** avec un rendement de 47% (Figure 43).

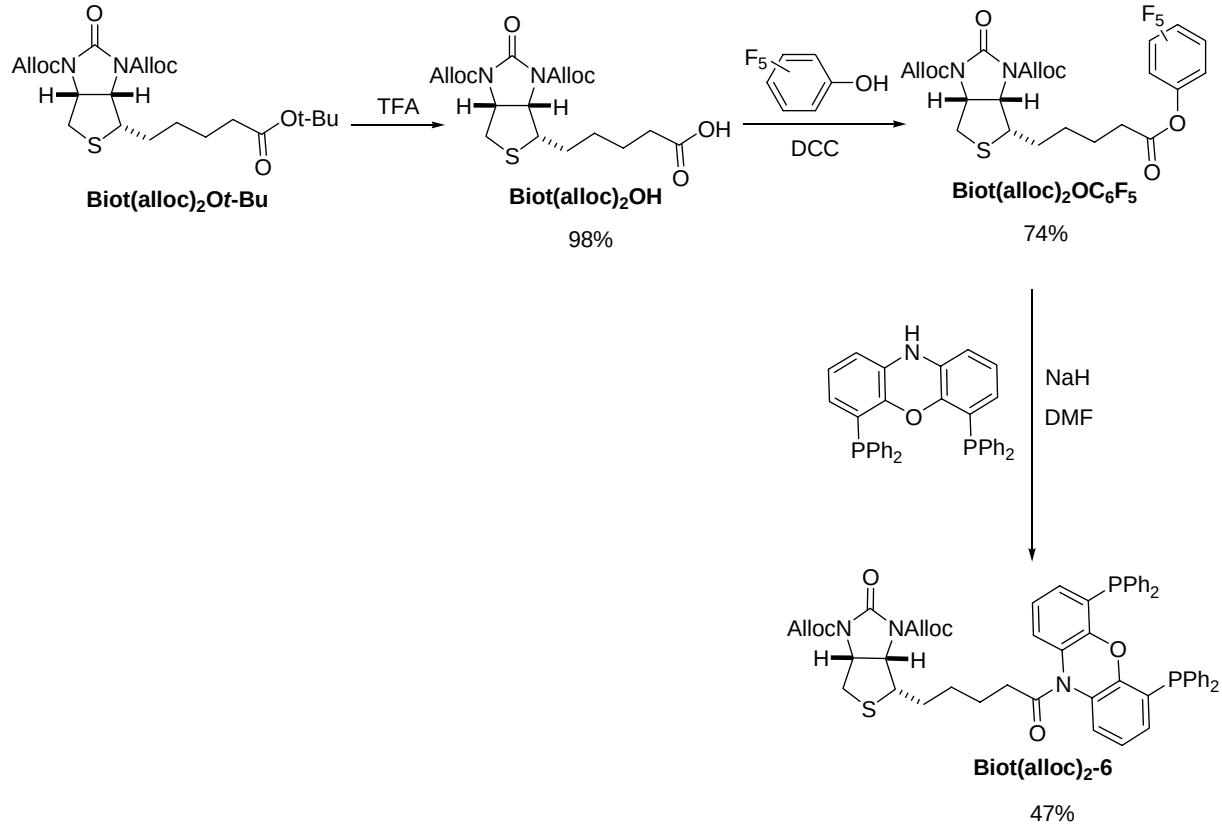
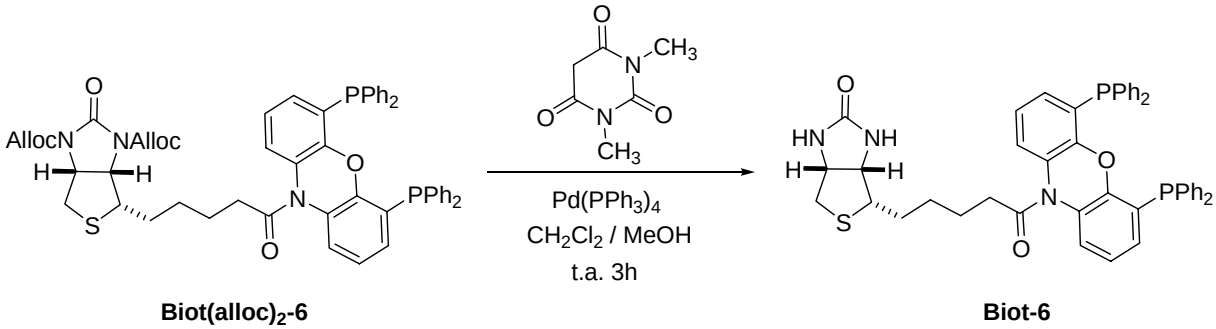


Figure 43. Synthèse de **Biot(alloc)$_2$-6**.

La libération des fonctions **Alloc** de **Biot(alloc)$_2$-6** est effectué dans des conditions douces en présence du tetrakis triphenylphosphine (palladium) comme catalyseur et de l'acide *N*,*N'*-dimethylbarbiturique comme nucléophile[102]. Cette méthode permet alors d'obtenir le ligand **Biot-6** (Figure 44). Cependant, de meilleures conditions de purification de ce produit sont encore à l'étude au laboratoire.



Biot(alloc)$_2$-6 **Biot-6**

Figure 44. Clivage des fonctions **Alloc** de l'urée de la biotine.

En conclusion, grâce la modularité de nos ligands biotinylés nous avons synthétisé 26 ligands différents qui présentent des variations au niveau du chélate mais aussi au niveau des espaceurs présent entre la biotine et la partie diphosphine. Ainsi, nous avons à notre disposition une petite bibliothèque de ligands biotinylés pouvant être testés pour l'hydrogénation énantioséléctive d'oléfine prochirales.

3. Optimisation génétique

3.1. Avidine

L'avidine est une protéine riche en résidus lysine et arginine qui lui confèrent un point isoélectrique élevé de 10.4. Nous suspections que ce facteur pouvait avoir une influence sur la catalyse en diminuant l'affinité du précatalyseur biotinylé cationique pour l'avidine. Grâce au Dr. Andrea Zocchi nous avons pu obtenir une avidine glycosylée recombinante (r-GAvi) possédant un point isoélectrique plus bas pI = 5.4.

En comparaison avec l'avidine wild type (WT Avi), la r-GAvi contient des mutations au niveau de : K3E : la lysine en position 3 (K3) est substituée par le glutamate (E).

K9D : la lysine en position 9 (K9) est substituée par l'aspartate (D).

R122A : l'arginine en position 122 (R122) est substituée par l'alanine (A).

R124A : l'arginine en position 124 (R124) est substituée par l'alanine (A).

Ces mutations permettent de diminuer le point isoélectrique à 7.2, l'addition de trois aminoacides supplémentaires glutamate – alanine - glutamate en position *N*-terminale permet alors d'obtenir un pI =5.4.

3.2. Streptavidine

En remplaçant des aminoacides de la streptavidine par des résidus glycines qui apportent une grande flexibilité[103,104], nous espérons perturber la structure de la protéine et influencer ainsi l'énantioséléctivité de la réaction. L'intérêt de cette démarche étant de ne pas modifier les aminoacides directement impliqués dans les interactions biotine-(strept)avidine afin de ne pas modifier l'affinité de la protéine pour la biotine. Quatre mutations ont été réalisées par le Dr. Nicolas Humbert à différents niveaux de la protéine wild type (S112G, V47G, K80G, P64G):

i) Aminoacide proche du métal (S112): la sérine en position 112 se situe à la charnière du loop 7,8 (à la jonction du feuillet β et du loop). Ce loop porte le résidu tryptophane 120 responsable d'interactions hydrophobes avec la biotine du monomère adjacent, se trouve dans un environnement proche du métal au cours de la catalyse.

ii) Aminoacide participant à la seconde sphère de coordination de la biotine (V47): La valine en position 47 interagit avec la sérine 45 (S45) qui à son tour forme une liaison hydrogène avec un groupement N-H de la biotine.

iii) Aminoacide proche de la seconde sphère de coordination de la biotine (K80): La lysine en position 80 qui se trouve dans le loop 5,6 est proche du tryptophane 79 (W79). Ce dernier forme une liaison hydrogène avec la thréonine 90 (T90) qui à son tour interagit avec la fonction thioether de la biotine.

iv) Aminoacide éloigné du site de la biotine (P64): La proline en position 64 se trouve sur le loop 4,5 à l'opposé du site de la protéine, mais proche du site actif du monomère adjacent. De plus la proline est connue pour jouer un rôle structural important, la substitution de cet aminoacide pourrait avoir des effets non négligeables sur la structure de la protéine.

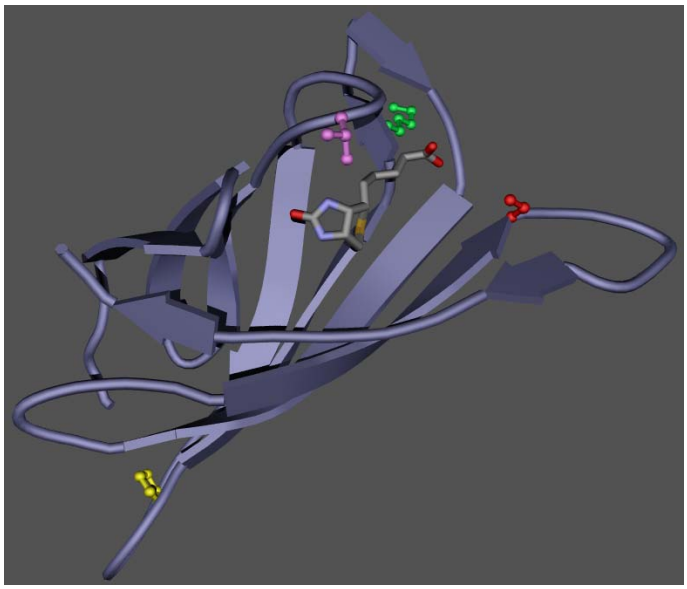


Figure 45. Représentation des mutations S112G (rouge), V47G (violet), K80G (vert), P64G (jaune) au niveau d'un monomère de la streptavidine.

4. Hydrogénation énantiosélective par métalloenzymes artificielles

4.1. Détermination du nombre de sites actifs de la protéine

Pour nos réactions de catalyses il est nécessaire de connaître le nombre de sites actifs de la protéine tétramérique. En effet, certains sites de la protéine peuvent être saturés en biotine provenant du milieu de culture et rendre ainsi ces sites non disponibles pour recevoir notre ligand biotinylé.

Une des deux méthodes utilisée afin de déterminer l'activité de la protéine est un titrage direct par un fluorophore biotinylé[105] (Figure 46). Lorsque la biotine-4-fluorescéine se trouve dans la poche de la protéine sa fluorescence est quenchée. Il est donc possible de déterminer à partir de la courbe de titrage (intensité de la fluorescence en fonction du nombre de moles de biotine-4-fluorescéine ajoutés) le point d'équivalence et par conséquent le nombre de sites actifs.

Cependant, cette méthode pratique (elle nécessite peu de protéine) est parfois peu satisfaisante pour le titrage de l'avidine ou de certains mutants[106]. Une autre méthode est un titrage indirect par l'acide 2-(4'-hydroxyazobenzène)benzoïque (HABA) (Figure 46) en spectrophotométrie visible (506 nm).[107] Le principe repose sur le fait que le HABA possède une affinité de l'ordre de 10^4 à 10^5 M^{-1} pour la (strept)avidine[67]. Ainsi l'addition de biotine permet de déplacer le HABA de la cavité protéique et de mesurer une différence d'absorbance. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite une plus grande quantité de protéine par rapport au titrage par la biotine-4-fluorescéine.

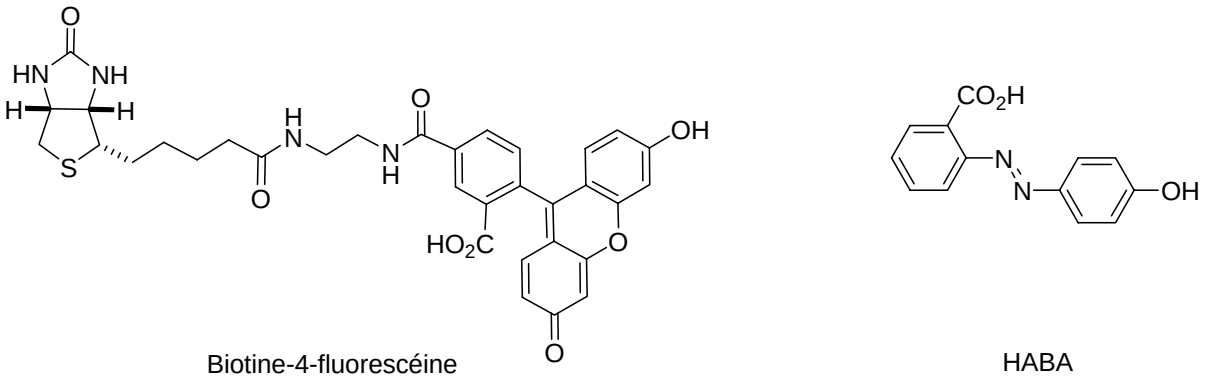


Figure 46. Structure de la biotine-4-fluorescéine et de l'acide 2-(4'-hydroxyazobenzène) benzoïque.

Pour les expériences de catalyse, la masse molaire de la protéine tétramérique est ainsi adaptée au nombre de sites actifs déterminés par l'une des deux méthodes. En effet, si le nombre de sites actifs trouvé est égale à x, et en sachant que la masse molaire de la protéine tetramérique est M_x, on peut recalculer la masse molaire M de la protéine tétramérique correspondant à 4 sites actifs, tel que : $M = M_x \times (4/x)$. De cette manière, le poids moléculaire de la protéine est recalculé de façon à avoir 4 sites actifs par mole de protéine.

4.2. Conditions de catalyse

Afin d'assurer une efficacité totale du catalyseur (**Biot–Ligand**)-rhodium, il est nécessaire d'éliminer l'oxygène présent dans les différentes solutions. Pour cela chaque solution est dégazée pendant 3 heures sous azote, puis transférée dans une boîte à gants où s'effectue la préparation du mélange réactionnel.

Le précatalyseur [Rh(COD)(**Biot–Ligand**)]$^{-}BF_4^{+}$ est préparé *in situ* en faisant réagir le complexe $[Rh(COD)_2]BF_4$ avec un ligand biotinylé à température ambiante dans du DMSO. Ainsi le

précatalyseur obtenu est le seul composé de catalyse à se trouver en phase organique à cause de la faible solubilité dans l'eau des ligands biotinylés utilisés, le reste des réactifs (substrat et protéine) est solubilisé en phase aqueuse. De plus, afin d'avoir un pH constant tout au long de la réaction nous utilisons une solution tamponnée (Figure 47).

D'autre part, afin d'assurer la présence du complexe biotinylé dans la protéine le rapport [Rh(COD)(**Biot–Ligand**)]$^{+}$: protéine est fixé à 3 : 1 lors de toutes les catalyses (i.e. : trois sites occupés sur les quatre sites de la protéine tétramérique). Des études préliminaires réalisées avec le Dr. J. Collot ont montrés qu'en faisant varier ce rapport de 1 : 1 à 4 : 1 (i.e. : tous les sites occupés), on observe une légère augmentation de l'énantiosélectivité ce qui suggère l'existence d'une coopérativité entre les quatre sites de la protéine sur l'énantiosélectivité.[108] De plus, les récentes études du Dr. A. Loosli et Mr. E. Rusbandi sur la détermination des constantes d'affinité, montrent qu'il existe aussi une coopérativité entre les sites de la protéine.[109]

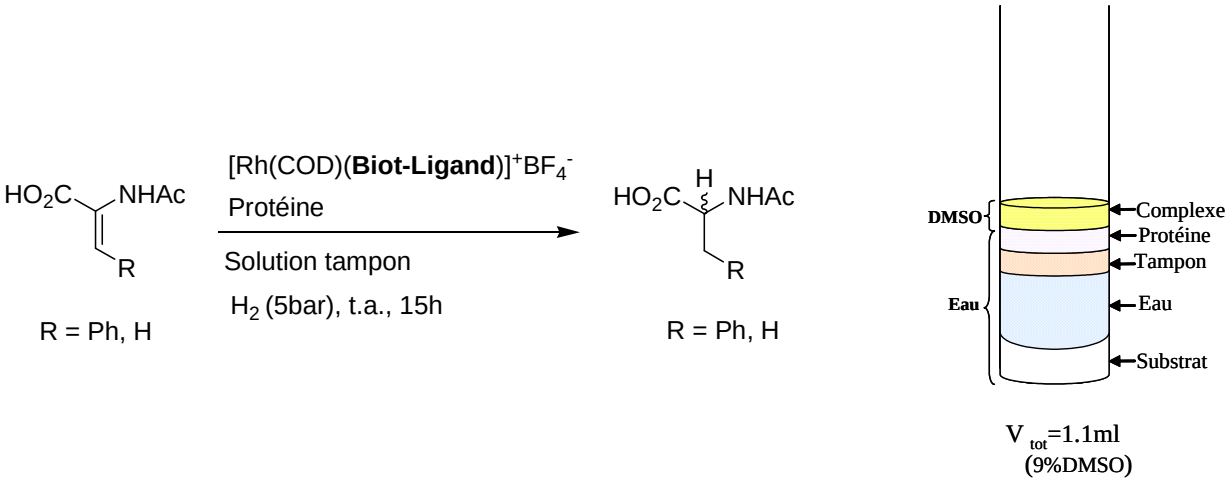


Figure 47. Conditions de catalyses. La protéine et le substrat sont en phase aqueuse et le le précatalyseur biotinylé de rhodium dans du DMSO.

Comme pour toutes les techniques de criblage, le facteur coût doit être pris en compte lors de la mise en place du système. Pour cela nous travaillons dans des conditions opératoires qui permettent d'utiliser de faibles quantités de protéine tout en permettant une bonne reproductibilité des résultats de catalyse (Tableau 3).

	Substrat	$Rh(COD)_2BF_4$	Biot-diphosphine	Streptavidine
M (g/mol)	129	406	668	70270
n (mol)	$6.2\ 10^{-6}$	$6.2\ 10^{-8}$	$8.1\ 10^{-8}$	$2.1\ 10^{-8}$
m (mg)	0.8	0.025	0.054	1.5
eq / $Rh(COD)_2BF_4$	100	1	1.3	0.33

Tableau 3. Exemple de catalyse avec une streptavidine wild type quantifiée à 3.74 sites actifs/4 (M_x = 65700 g/mol).

4.3. Catalyse sans protéine

Les réactions de catalyses sont réalisées dans un premier temps sans protéine, afin de vérifier qu'aucune énantiosélectivité n'est induite par le ligand biotinylé (3 centres de chiralité sur la biotine) ou les espaceurs chiraux (Figure 48). Les 26 ligands biotinylés: **Biot–NP_2**, **Biot–3^n–NP_2** (n = 1 – 5), **Biot–4^q–NP_2** (q = *meta*-, *ortho*- et *para*-), **Biot-Phe-NP_2** ((*S*) et (*R*)) et **Biot-Pro-NP_2** ((*S*) et (*R*)) ont été testés pour l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique en phase aqueuse (+ 9% de DMSO nécessaires pour solubiliser le complexe).

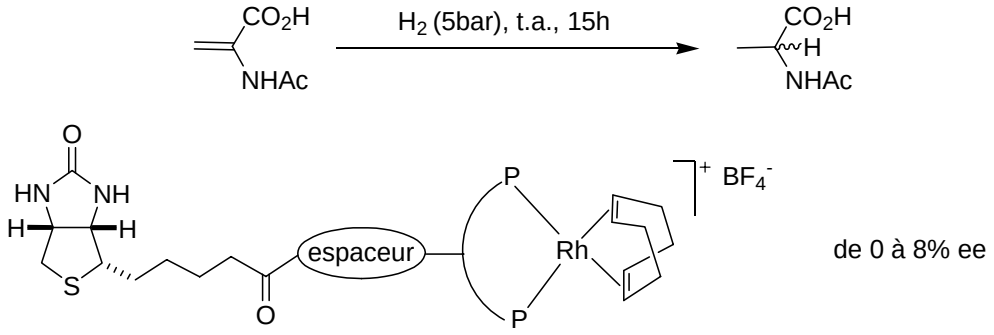


Figure 48. Hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique sans protéine.

Les résultats montrent que le plus haut excès énantiomérique pouvant être obtenu dans ces conditions est de 8% avec la **(*S*)-Pro** comme espaceur entre la biotine et l'aminodiphosphine **1**. Quant au reste des ligands biotinylés, les excès énantiomériques varient entre 0 et 7%. De plus, on remarque qu'après 15h de réaction sans protéine la conversion n'est pas toujours totale (entre 80% et 100%).

Ligand	ee (%)	Conversion (%)
Biot–1	0	81
Biot–4^{ortho}–1	4 (*R*)	84
Biot-(*S*)-Phe-1	7 (*S*)	100
Biot-(*R*)-Phe-1	3 (*R*)	91
Biot-(*S*)-Phe-2	7 (*S*)	92
Biot-(*R*)-Phe-2	2 (*R*)	100
Biot-(*S*)-Pro-1	8 (*R*)	100
Biot-(*R*)-Pro-1	3 (*R*)	100
Biot-(*S*)-Pro-2	8 (*S*)	100
Biot-(*R*)-Pro-2	0	100

Tableau 4. Quelques résultats d'hydrogénation de l'acide *N*-α–acétamidoacrylique en absence de protéine.

4.4. Influence du pH et de la nature du tampon

L'étude de l'influence du pH et de la nature du tampon sur l'hydrogénation de l'acide N-α-acétamidoacrylique en présence de protéine montre en général une variation au niveau de la conversion de l'ordre de ±10% et au niveau de l'énantiosélectivité de ±5%. Les meilleurs résultats de catalyse sont obtenus à pH = 4 avec la streptavidine et à pH = 7 avec l'avidine.

Cependant, dans le cas de certains ligands on peut observer une influence non négligeable sur l'excès énantiomérique au cours de l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique. Ainsi les deux cas les plus flagrants sont présentés ci-desous :

1. Dans le cas de **Biot-1** : en présence d'avidine il est nécessaire pour obtenir un excès énantiomérique de 39% (*S*) de travailler avec un tampon phosphate de 0.07M et un équivalent de Na_2HPO_4 par rapport au substrat. Aucune sélectivité n'est observée si la catalyse est effectuée à pH 7 dans du MOPS 0.1M (acide 3-(*N*-Morpholino) propanesulfonique) ou sans tampon (pH = 3.2). Dans ce cas la déprotonation du substrat semble être nécessaire pour obtenir une certaine énantiosélectivité.

2. Dans le cas de **Biot-3^5-1** : lorsqu'on travaille avec ce ligand en présence de streptavidine à pH = 7 (phosphate 0.1M), on observe une augmentation de l'énantioséléctivité (+ 31%) et une diminution de la conversion de la réaction (– 35%) par rapport aux conditions standards (i.e. : pH = 4 acétate 0.1M). En d'autres termes, pour l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique à pH = 4 nous obtenons quantitativement un ee de 20% en faveur de l'énantiomère (*S*) alors que la même réaction réalisée à pH = 7 permet de former la *N*-α-acétamidoalanine avec 51% ee (*S*) et une conversion de 65%. On peut supposer qu'un tel changement du pH influence les aminoacides à chaînes latérales acides ayant une valeur de pKa comprise entre 4 et 7. C'est le cas de l'acide

glutamique (pKa = 4.1) et de l'histidine (pKa = 6) qui vraisemblablement (par exemple en positions E116 et H87) se trouvent proches du métal (Figure 49), dans le cas de **Biot-3^{5}-1**, et influencent ainsi plus fortement l'énantiosélectivité et la cinétique de la réaction par rapport aux autres ligands.

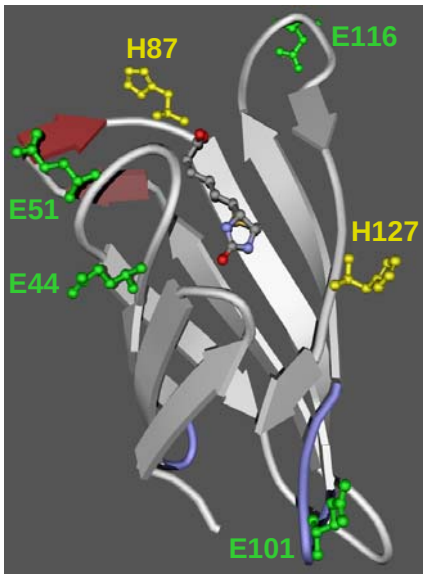


Figure 49. Représentation d'un monomère de la streptavidine. Les zones bleues – grises – rouges représentent les valeurs de pKa croissantes. L'acide glutamique en vert (E44, E51, E101 et E116) et l'histidine en jaune (H87 et H127).

5. Résultats de catalyse en présence de métalloenzymes artificielles

5.1. Criblage des ligands biotinylés sans et avec espaceurs achiraux

Les premières expériences de criblages sont réalisées à l'aide des dix-huit ligands **Biot–1**, **Biot–2**, **Biot–3^{n}–1, Biot–3^{n}–2, Biot–4^{q}–1, Biot–4^{q}–2** (n = 1-5, q = *ortho*-, *meta*-, et *para*-) pour l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique.

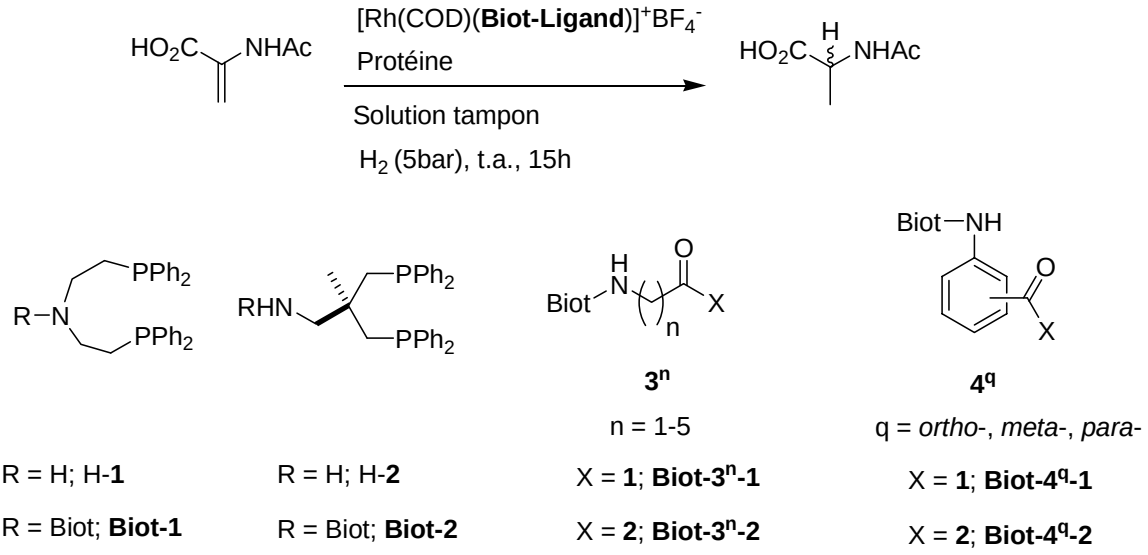


Figure 50. Hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique à l'aide des ligands biotinylés avec et sans espaceurs nonchiraux.

5.1.1. Catalyses en présence des protéines Wild Type (WT Sav et WT Avi)

Les résultats présentés dans le Tableau 5 proviennent des expériences réalisées dans un tampon acétate (0.1 M, pH = 4.0) pour la streptavidine et dans un tampon MOPS (0.1 M, pH = 7.0) pour l'avidine, sauf dans le cas de la **Biot–1** avec l'avidine où la catalyse est effectuée dans un tampon phosphate (0.07 M, pH = 7.1).

Ligand	ee (%) WT Sav	ee (%) WT Avi	Ligand	ee (%) WT Sav	ee (%) WT Avi
Biot–1	94	-39	**Biot–2**	-16[a]	0[b]
Biot–3^{1}–1	-24	-57	**Biot–3^{1}–2**	31	-80
Biot–3^{2}–1	-17	-60	**Biot–3^{2}–2**	-27	-9
Biot–3^{3}–1	20	0	**Biot–3^{3}–2**	13	-13
Biot–3^{4}–1	-26	4	**Biot–3^{4}–2**	38	4
Biot–3^{5}–1	-20	-23	**Biot–3^{5}–2**	0	-12
Biot–4^{ortho}–1	19	2	**Biot–4^{ortho}–2**	-28	34
Biot–4^{meta}–1	-35	-21	**Biot–4^{meta}–2**	15	0
Biot–4^{para}–1	16	-11	**Biot–4^{para}–2**	-20[d]	17

Tableau 5. Les valeurs positives de ee sont en faveur de l'énantiomère (*R*) et les valeurs négatives sont en faveur de l'énantiomère (*S*). En dehors de quelques cas, les conversions sont quantitatives après 15h à t.a. [a] conversion > 80%; [b] conversion > 70%; [d] conversion > 50%.

Dans le cas de la streptavidine wild type, on remarque que le précatalyseur [Rh(COD)(**Biot-1**)]$^{+}$ présente la meilleure énantiosélectivité en faveur de l'énantiomère (*R*) (94% ee), alors qu'avec son homologue **Biot-2** on forme la *N*-acétamidoalanine avec seulement 20% ee (*S*) et un taux de conversion de l'ordre de 80% après 15h de réaction. Dans le cas de l'avidine wild type, le

ligand **Biot-1** permet d'obtenir un ee de 39% en faveur de l'énantiomère (*S*), et un mélange racémique avec **Biot-2**.

L'addition d'espaceurs glycine et/ou β-alanine dans le cas de l'avidine a un effet bénéfique sur l'activité et la sélectivité des catalyseurs, tel que **Biot–3^2–1** conduit à 60% ee (*S*) et **Biot–3^1–2** au meilleur excès énantiomérique en faveur de l'énantiomère (*S*) dans cette protéine (80% ee). Alors que pour la streptavidine on observe une inversion de l'énantiosélectivité par rapport aux ligands sans espaceur, puisque **Biot–3^1–1** et **Biot–3^1–2** donnent respectivement 24% ee (*S*) et 31% ee (*R*). L'introduction des différents espaceurs apporte, pour la streptavidine, une grande variation de l'excès énantiomérique. On observe la plus grande diminution –59% pour **Biot–4^{para}–1** qui correspond au plus haut ee (35 %) en faveur de l'énantiomère (*S*). Pour l'avidine, la plus grande augmentation +46 % est avec **Biot–4^{ortho}–2** ce qui correspond au plus haut ee (34 %) en faveur de l'énantiomère (*R*).

D'après ces résultats, on remarque qu'en général la streptavidine est un meilleur inducteur chiral que l'avidine, et que l'introduction d'aminoacides achiraux entre la biotine et les ligands aminodiphosphines permet de sonder la cavité protéique et de trouver le meilleur environnement chiral pour une bonne énantiosélectivité. D'autre part, chacun des deux énantiomères peut être obtenu préférentiellement avec les deux protéines, tel que la streptavidine produit préférentiellement l'énantiomère (*R*) et l'avidine le l'énantiomère (*S*).

De plus, on remarque que le ligand diphosphine **1** catalyse la réduction de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique avec une meilleure énantiosélectivité que le ligand **2**. Ceci suggère qu'un ligand plus flexible subira plus fortement l'influence de son environnement chiral et que de ce fait la conformation du chélate influence l'énantiosélectivité de la réaction.[110,111] En effet, en

catalyse homogène l'énantioselectivité de la réaction est souvent contrôlée par l'orientation des groupements phényles sur les atomes de phosphores qui subissent l'influence de la conformation du cycle formé par la diphosphine et le métal.[112] Ainsi dans le cas de nos métalloenzymes artificielles on peut imaginer que l'environnement chiral de la protéine, qui varie selon le ligand utilisé, va influencer préférentiellement une certaine conformation de ce cycle et par conséquent une disposition des groupements phényles.

D'autre part, on peut penser que l'environnement généré par la protéine peut lui aussi influencer l'approche du substrat au niveau du métal préférentiellement sur l'une de ses face *Si* ou *Re* et conduire ainsi à une réaction énantiosélective.

5.1.2. Catalyses en présences des mutants (optimisation chimique et génétique)

Ces expériences de criblages sont réalisées à l'aide des dix-huit ligands **Biot–1**, **Biot–2**, **Biot–3^n–1, Biot–3^n–2, Biot–4^q–1, Biot–4^q–2** (n = 1-5, q = *ortho*-, *meta*-, et *para*-) en présence des cinq mutants: r-GAvi, V47G, P64G, K80G, S112G, pour l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique.

Les résultats présentés dans le Tableau 6 proviennent des expériences réalisées dans un tampon acétate (0.1 M, pH = 4.0) pour la streptavidine et ses mutants, et dans un tampon MOPS (0.1 M, pH = 7.0) pour l'avidine et la r-GAvi, sauf dans le cas de la **Biot–1** avec l'avidine où la catalyse est effectuée dans un tampon phosphate (0.07 M, pH = 7.1).

Ligand	ee (%) WT Sav	ee (%) S112G	ee (%) V47G	ee (%) K80G	ee (%) P64G	ee (%) WT Avi	ee (%) r-GAvi
Biot–1	94	96	26	85	90	-39	-7
Biot–3^{1}–1	-24	-13	-3	-25	-30	-57	-50[b]
Biot–3^{2}–1	-17	-28	-5	-13	-16	-60	-56[a]
Biot–3^{3}–1	20	0	24	20	14	0	0[b]
Biot–3^{4}–1	-26	20	0	-8	-17	4	9[b]
Biot–3^{5}–1	-20	0	14	-12	-17	-23	-9[c]
Biot–4^{ortho}–1	19	15	0	14	10	2	0[f]
Biot–4^{meta}–1	-35	0	-50	-24	-29	-21	-17[a]
Biot–4^{para}–1	16	14	11	14	17	-11	-14[b]
Biot–2	-16[b]	-20	0	-12[e]	-10[c]	0[c]	0[f]
Biot–3^{1}–2	31	-31	7	25	32	-80	-76[b]
Biot–3^{2}–2	-27	-8	-19	-27	-32	-9	-10[c]
Biot–3^{3}–2	13	20	17	10	15	-13	-11
Biot–3^{4}–2	38	40	31	40	36	4	9
Biot–3^{5}–2	0	22	5	0	0	-12	-11[a]
Biot–4^{ortho}–2	-28	-57	44	-40	-47	34	30[g]
Biot–4^{meta}–2	15	32	32	17	18	0	-4[a]
Biot–4^{para}–2	-20[e]	7[c]	-20[c]	-20	-20[e]	17	23[a]

Tableau 6. Les valeurs positives d'ee sont en faveur de l'énantiomère (*R*) et les valeurs négatives sont en faveur de l'énantiomère (*S*). En dehors de quelques cas, les conversions sont quantitatives après 15h à t.a. [a] conversion > 90%; [b] conversion > 80%; [c] conversion > 70%; [d] conversion > 60%; [e] conversion > 50%; [f] conversion > 40%; [g] conversion > 30%.

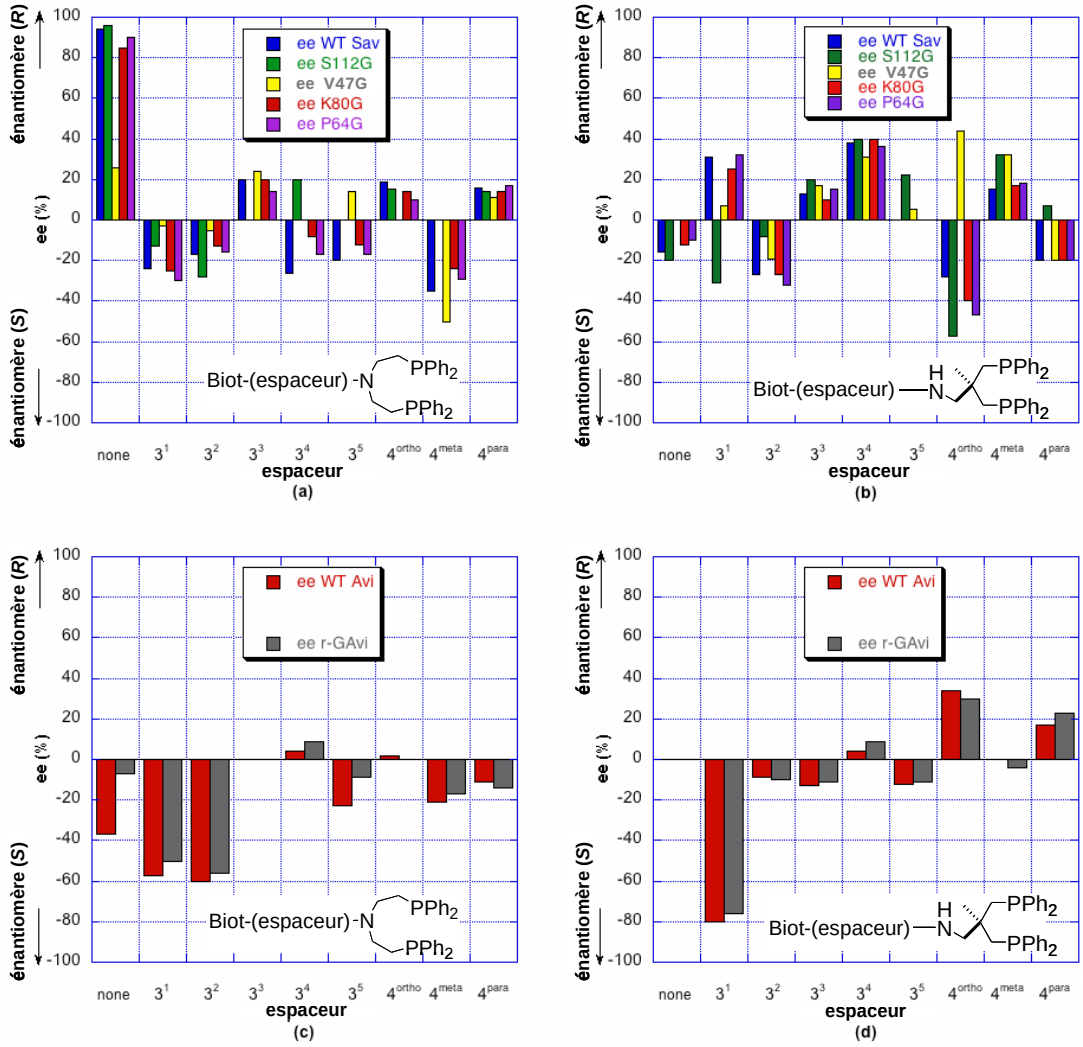


Figure 51. Représentation graphique des excès énantiomériques obtenus pour la réduction de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique avec : a) le ligand diphosphine 1 dans la famille de la streptavidine, b) le ligand diphosphine 2 dans la famille de la streptavidine, c) le ligand diphosphine 1 dans la famille de l'avidine, d) le ligand diphosphine 2 dans la famille de l'avidine.

Dans la famille de la streptavidine (Figure 51 a et b), K80G et P64G n'apportent pas une grande variabilité de l'ee par rapport à la WT Sav (plus grande augmentation +19 % pour **Biot–4^{ortho}–2**; plus grande diminution –18 % pour **Biot–3^{4}–1**). Au contraire, S112G et V47G présentent une grande variabilité par rapport à la WT Sav. En particulier, **Biot–4^{ortho}–2** montre la plus grande augmentation de ee (+28 % dans S112G, qui correspond au plus haut ee (57 % (*S*)) en faveur de l'énantiomère (*S*) dans la famille de la streptavidine) et la plus grande diminution de ee (-72 % dans V47G) pour tout les mutants testés (Figure 51b). **Biot–1** permet d'obtenir le plus haut ee en faveur de l'énantiomère (*R*) (96 % (*R*) dans S112G) et la seconde plus grande diminution (- 68 % dans V47G) (Figure 51a). Ces résultats suggèrent que **Biot–4^{ortho}–2** et **Biot–1** sont particulièrement sensibles à l'environement de la protéine.

Dans la famille de l'avidine (Figure 51 c et d), où **Biot–3^{1}–2** donne le plus fort ee en faveur de l'énantiomère (*S*) (80 % (*S*)), aucune variation significative avec la r-GAvi par rapport à la WT Avi n'est observée (la plus grande augmentation +6 % pour **Biot–4^{para}–2**, la plus grande diminution –30 % pour **Biot–1**). De plus, on observe que comme la WT Avi, r-GAvi conduit principalement à la formation de l'énantiomère (*S)*.

Ces résultats semblent confirmer que les mutations se trouvant proches du site actif affectent la sélectivité de façon plus significative que les mutations plus éloignées.[113] On observe que les mutations qui affectent les interactions de la seconde sphère de coordination avec la biotine (V47G) ou qui se trouvent proches du métal (S112G) apportent une plus grande variabilité que les résidus se trouvant sur les loops éloignés (P64 dans la streptavidine et K3, K9, R122 et R124 dans l'avidine) ou ceux proches mais non impliqués dans les interactions de la seconde sphère de coordination avec la biotine (K80G).

D’autre part, les catalyses effectuées en présence de la r-GAvi (pI = 5.4) ne montrent pas de grande variabilité dans les résultats par rapport à la WT Avi (pI = 10.4), ce qui laisse suggérer que le point isoélectrique de la protéine n’est pas un facteur pouvant influencer l’efficacité de la catalyse de manière significative. De plus, les résultats obtenus par le Dr. A. Loosli montrent que les constantes d’affinités de **Biot-1** pour la streptavidine (pI = 6.4) et l’avidine sont très proches : log ($K_{[Rh(COD)(\mathbf{Biot\text{-}1})]^+ \subset Avi}$) = 7.7 et log ($K_{[Rh(COD)(\mathbf{Biot\text{-}1})]^+ \subset Sav}$) = 7.2.[114]

De ce fait nous pouvons dire que pour une valeur de pH donnée, l’affinité du précatalyseur cationique est indépendante du point isoélectrique de la protéine, et que la différence d’efficacité de la catalyse n’est pas dûe à une différence d’affinité mais plutôt à une différence de topographie des cavités protéiques.

5.2. Spécificité du substrat

Afin de tester la spécificité de notre système catalytique pour des substrats de différentes tailles, nous avons combiné au cours d’une même réaction de catalyse les acides *N*-α-acétamidoacrylique et *N*-α-acétamidocinnamique (Figure 52).[115] Une telle approche permet de mettre en évidence un système (ligand ⊂ protéine) capable de discriminer un substrat par rapport à l’autre comme cela est possible en catalyse enzymatique.

Les premières expériences réalisées au laboratoire montrent que l’hydrogénation du mélange d’acides *N*-α-acétamidoacrylique et *N*-α-acétamidocinnamique à pH 5.5 (MES, 0.1M) avec le système [Rh(COD)(**Biot-1**)]$^+$ ⊂ streptavidine, conduit à la formation de la (*R*) acétamidoalanine et de la (*R*) acétamidophenylalanine avec 94% ee dans chaque cas (avec respectivement 100% et

85% de conversion). À partir de ces premiers résultats il apparaît que notre métalloenzyme artificielle n'opère aucune discrimination au niveau de ces deux substrats (par rapport à leur taille), ce qui est caractéristique de la catalyse chimique.

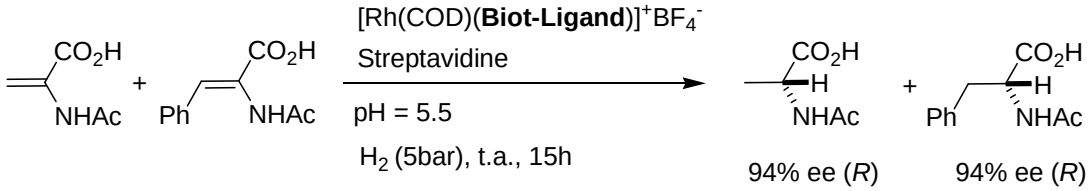


Figure 52. Hydrogénation du mélange d'acides *N*-α-acétamidoacrylique et *N*-α-acétamidocinnamique.

5.3. Criblage des ligands biotinylés avec espaceurs chiraux

Ces expériences de catalyses sont réalisées avec les huit ligands **Biot-(*R*)-Phe-1**, **Biot-(*S*)-Phe-1**, **Biot-(*R*)-Pro-1**, **Biot-(*S*)-Pro-1**, **Biot-(*R*)-Phe-2**, **Biot-(*S*)-Phe-2**, **Biot-(*R*)-Pro-2** et **Biot-(*S*)-Pro-2** en présence des deux protéines wild type: WT Avi et WT Sav (Figure 53).

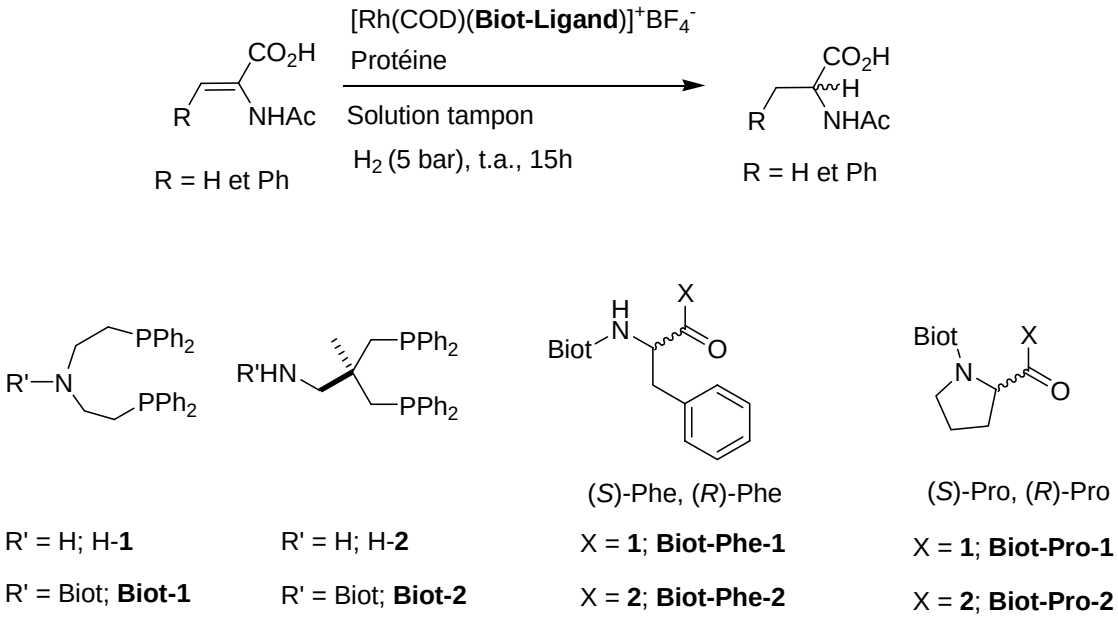


Figure 53. Hydrogénation du mélange d'acides *N*-α-acétamidoacrylique et *N*-α-acétamidocinnamique à l'aide des ligands biotinylés avec espaceurs chiraux.

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 7) proviennent des catalyses réalisées en présence du mélange d'acides *N*-α-acétamidoacrylique et *N*-α-acétamidocinnamique ; dans un tampon MES (0.1 M, pH = 5.5) pour la WT Sav et dans un tampon MOPS (0.1 M, pH = 7.0) pour la WT Avi.

	WT Avi				WT Sav			
	R = H		R = Ph		R = H		R = Ph	
	ee	Conv.	ee	Conv.	ee	Conv.	ee	Conv.
Biot-(*R*)-Phe-1	-5	100	-10	60	65	100	63	100
Biot-(*S*)-Phe-1	-12	100	-12	98	-73	100	-64	87
Biot-(*R*)-Pro-1	-87	100	-89	100	-87	100	-91	100
Biot-(*S*)-Pro-1	12	100	20	75	21	100	23	100
Biot-(*R*)-Phe-2	2	100	-19	55	5	100	6	68
Biot-(*S*)-Phe-2	5	100	60	87	-56	100	-16	37
Biot-(*R*)-Pro-2	-4	100	-17	45	9	100	-14	54
Biot-(*S*)-Pro-2	4	100	12	45	-40	100	-32	73

Tableau 7. Résultats de catalyse avec l'acide *N*-α-acétamidoacrylique (R = H) et l'acide *N*-α-acétamidocinnamique (R = Ph). Les ees et les conversions sont en %, les valeurs positives de ee sont en faveur de l'énantiomère (*R*) et les valeurs négatives sont en faveur de l'énantiomère (*S*).

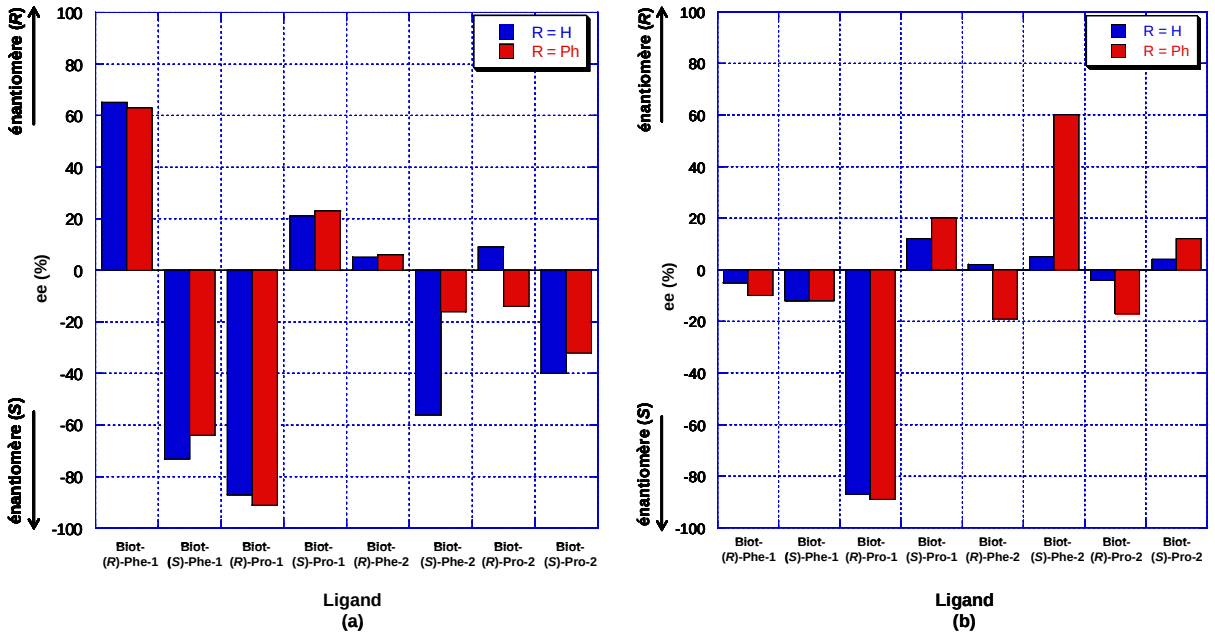


Figure 54. Représentation graphique des excès énantiomériques obtenus avec les espaceurs chiraux pour l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique (R = H) et de l'acide *N*-α-acétamidocinnamique (R = Ph) : a) en présence de streptavidine, b) en présence d'avidine.

Dans le cas de la streptavidine, on remarque que le ligand **Biot-(*R*)-Pro-1** présente la meilleure énantiosélectivité en faveur de l'énantiomère (*S*) pour l'acide *N*-α-acétamidoacrylique et l'acide *N*-α-acétamidocinnamique avec respectivement 87% ee et 91% ee. Alors que son diastéréoisomère **Biot-(*S*)-Pro-1** conduit à l'autre énantiomère (*R*) avec des valeurs de ee de l'ordre de 20% pour chaque substrat. Cette inversion de l'énantiosélectivité est beaucoup plus marquée dans le cas de **Biot-(*R*)-Phe-1** et **Biot-(*S*)-Phe-1**, puisqu'on observe que ces deux ligands conduisent respectivement aux énantiomères (*R*) et (*S*), quelque soit le substrat, avec des valeurs de ee proches (comprises entre 63% et 73%) (Figure 54).

Dans le cas de l'avidine, le ligand **Biot-(*R*)-Pro-1** conduit lui aussi au meilleur ee en faveur de l'énantiomère (*S*), avec respectivement des ee de 87% ee (*S*) et 89% ee (*S*) pour l'acide *N*-α-acétamidoacrylique et l'acide *N*-α-acétamidocinnamique. De plus, avec le ligand **Biot-(*R*)-Pro-1** on observe une discrimination au cours de l'hydrogénation des deux substrats, puisque on forme la (*R*) acétamidoalanine avec seulement 5% ee contre 60% ee (*R*) pour l'acétamidophenylalanine (Figure 54).

Les catalyses effectuées avec ces ligands chiraux montrent des résultats très intéressants par rapport à leurs homologues non chiraux (**Biot–3^1–1** et **Biot–3^1–2**) pour l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique. En effet, l'introduction d'une chaîne latérale au niveau d'un espaceur **3^1** conduit dans la streptavidine à la plus grande augmentation de l'excès énantiomérique avec la **Biot-(*R*)-Pro-1** (+63%) ce qui correspond au plus haut ee (87%) en faveur de l'énantiomère (*S*), et à la plus grande diminution de ee avec **Biot-(*R*)-Phe-1** (– 89%) par rapport à **Biot–3^1–1**.

Dans le cas de l'avidine, on observe que l'introduction d'espaceurs chiraux entre la biotine et l'aminodiphosphine **2** conduit à une diminution importante du ee par rapport à **Biot–3^1–2** puisqu'on note la plus grande diminution de ee avec **Biot-(*S*)-Phe-2** (– 85%).

D'autre part, on remarque que l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidocinnamique conduit généralement à des conversions de réactions moins bonnes qu'avec l'acide *N*-α-acétamidoacrylique (Tableau 7). Ceci est peut être dû au fait que ce substrat, de taille plus importante que l'acide *N*-α-acétamidoacrylique, a un accès plus difficile au catalyseur dans la poche protéique.

Grâce à l'introduction d'une **(*R*)-Pro** entre la biotine et l'aminodiphosphine **1**, nous avons pu non seulement améliorer l'énantiosélectivité en faveur de l'énantiomère (*S*) dans les deux protéines wild type, mais aussi trouver un ligand commun au deux protéines capable de former le même énantiomère avec une bonne énantiosélectivité. De plus, on remarque qu'il est possible de former dans la streptavidine, grâce à ces espaceurs chiraux, chacun des deux énantiomères très préférentiellement, et que la configuration absolue des aminoacides introduits entre la biotine et l'aminodiphosphine influence le sens de l'énantiosélectivité de la catalyse. Ainsi grâce à une disposition différente d'un même ligand dans la poche protéique, il est possible de former chacun des deux énantiomères.

D'autre part, ces résultats de catalyse confirment, comme précédemment, que le ligand diphosphine **1** catalyse la réduction de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique ainsi que de l'acide *N*-α-acétamidocinnamique avec de meilleures énantiosélectivités que le ligand **2**. Mais aussi que la position du catalyseur dans la protéine (i.e. : l'environnement chiral autour du catalyseur) joue un rôle primordial dans l'énantiosélectivité de la réaction.

6. Détermination des constantes de vitesse de la catalyse

Afin de connaître l'influence de la protéine sur la cinétique de la catalyse, nous avons voulu déterminer les constantes de vitesse de la catalyse avec et sans protéine (Figure 55). Nous avons choisi comme modèle de réaction l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique à l'aide du ligand **Biot-1** sans protéine puis en présence de streptavidine.

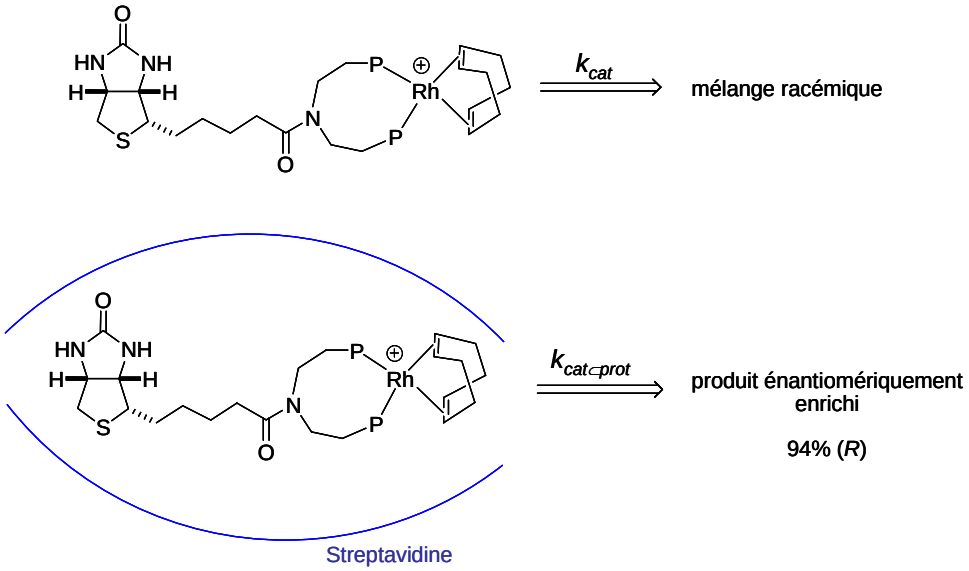


Figure 55. Représentation de constantes de vitesse k de la catalyse sans protéine et en présence de streptavidine à l'aide du ligand **Biot-1**.

Si l'on considère que nous sommes dans le cas d'une équation du "pseudo" premier ordre de type A $\rightarrow$ B où A correspond au substrat de départ (l'acide *N*-α-acétamidoacrylique) et B au produit d'hydrogénation (la *N*-acétamidoalanine). En effet, on peut considérer qu'au cours de la catalyse $[H_2]$, [A] >> [M] (ou [M] correspond à la concentration du catalyseur dans la réaction) on peut donc écrire l'équation de vitesse telle que :

$$v = -\frac{[A]}{dt} = k'[A]$$

$$\text{avec } k' = k[H_2]$$

$$\frac{d[A]}{[A]} = k'dt \quad \Rightarrow \quad -\int_{[A_0]}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = k'\int_0^t dt$$

$$-\ln\frac{[A]}{[A_0]} = k't \quad \Rightarrow \quad -\ln\frac{n_A}{n_{A0}} = k't$$

En traçant pour chaque cas les courbes de – ln (n_A/n_{A0}) en fonction du temps (Figure 56), on peut alors déterminer à partir de chaque graphe les constantes de vitesse k'_{cat} = 0.56 (sans protéine) et $k'_{cat\subset prot}$ = 1.31 (en présence de streptavidine), et calculer le rapport de ces deux constantes $k'_{cat\subset prot}/k'_{cat}$ comme étant égal à 2.34. Ainsi si le mécanisme de réaction dans et hors de la protéine est le même, on alors considérer que ce rapport $k'_{cat\subset prot}/k'_{cat}$ sera égal à $k_{cat\subset prot}/k_{cat}$. De ce fait, une catalyse réalisée en présence de streptavidine sera 2.34 fois plus rapide qu'une catalyse réalisée sans protéine.

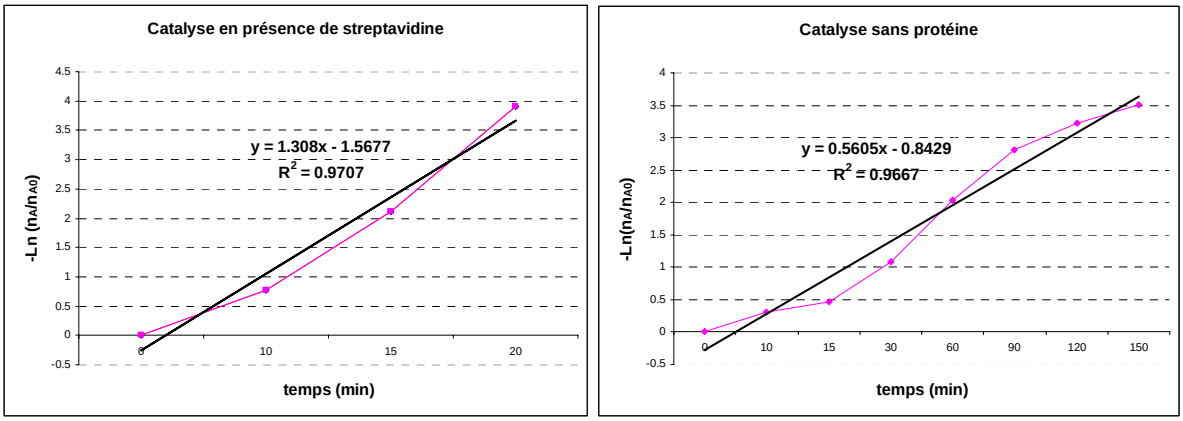


Figure 56. Courbes de f (t) = – ln (n_A/n_{A0}) dans le cas de l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique à l'aide du ligand **Biot-1** sans protéine puis en présence de streptavidine.

Par conséquent, en présence d'une métalloenzyme artificielle on observe une accélération de la catalyse par rapport à une catalyse ne contenant pas de protéine. On peut expliquer cet effet par le fait que la cavité de la protéine hôte est une poche hydrophobe qui favorise l'accumulation du substrat et optimise ainsi la réactivité du catalyseur par rapport à une réaction sans protéine. De plus, cette étude a permis de voir qu'en présence du système **Biot-1** ⊂ streptavidine la réaction atteint une conversion totale au bout de 25 min seulement.

7. Influence de la température sur la catalyse en présence de protéine

Dans un premier temps, nous avons voulu connaître la stabilité du système [Rh(COD)(**Biot-1**)]$^{+}\subset$ streptavidine face à des température élevées. Pour cela nous avons soumis le mélange de catalyse avant hydrogénation à des températures entre 25 et 100°C pendant 20min. L'analyse de ces échantillons montre que la protéine est tétramérique jusqu'à 90°C. Des études préliminaires[116] ont montrés que dans des conditions similaires la streptavidine seule est stable jusqu'à 63°C, au-delà la streptavidine apparaît sous forme monomérique. Ces résultats montrent que le ligand biotinylé apporte une certaine stabilité au système jusqu'à 90°C.

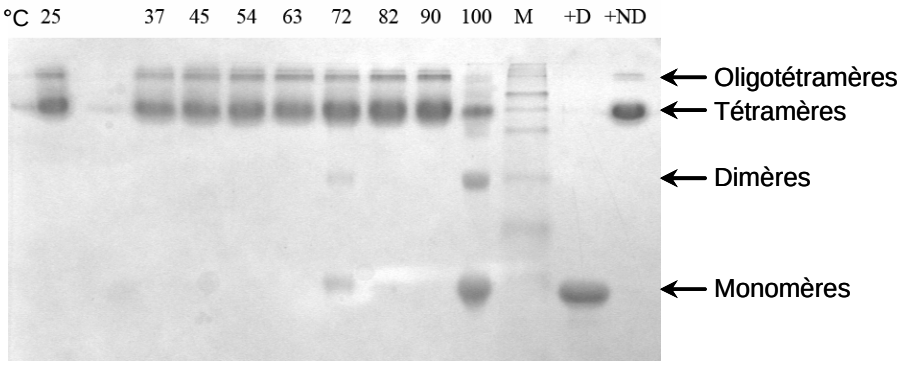


Figure 57. Détermination de la stabilité du tétramère de la streptavidine par SDS-PAGE.

Les catalyses effectuées avec le système [Rh(COD)(**Biot-1**)]$^{+}\subset$ streptavidine à différentes températures (0 à 90°C) montrent que la métalloenzyme artificielle réagit lentement jusqu'à 20°C. L'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique à 5 bars pendant 15h à 0°C et à 10°C conduit à la *N*-α-acétamidoalanine avec respectivement 33% de conversion (80% ee (*R*)) et 73% de conversion (85% ee (*R*)). On atteint une conversion totale avec 94% ee (*R*) dès 20°C et cela

est valable jusqu'à 30°C. Au delà de cette température, l'énantiosélectivité de la réaction diminue progressivement pour atteindre 44% ee (*R*) (100% de conversion) à 90°C (Figure 58).

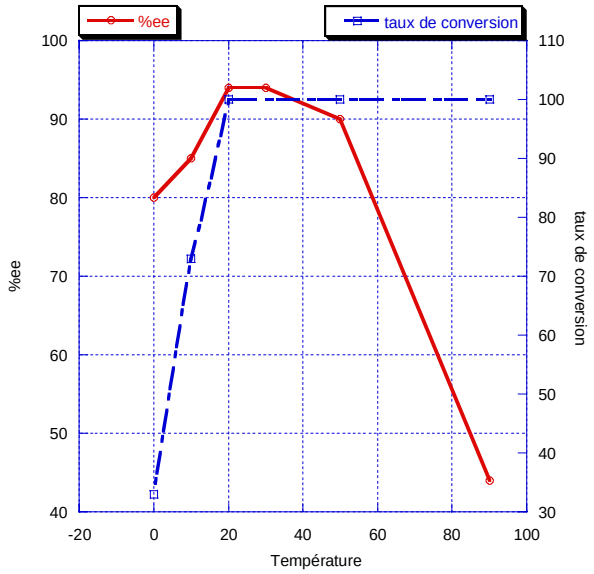


Figure 58. Effet de la température sur l'hydrogénation de l'acide *N*-α-acétamidoacrylique en présence de streptavidine.

Les études menées sur l'effet de la température en hydrogénation asymétrique, en présence de complexes de rhodium, montrent que l'excès énantiomérique de la réaction augmente en fonction de la température.[112] Cependant, il est aussi possible d'observer dans certains cas une diminution de l'excès énantiomérique à partir d'une certaine température.[117] Dans le cas de nos métalloenzymes artificielles, nous pouvons penser qu'une modification au niveau de la structure de la protéine à des températures élevées peut engendrer un changement au niveau de l'environnement chiral autour du métal, et par conséquent influencer l'énantiosélectivité de la réaction.

8. Influence des solvants organiques

Le système biotine ⊂ (strept)avidine est décrit dans la littérature comme étant stable à hautes températures et à différents pH. Cependant, nous avons pu remarquer que ces deux facteurs influencent l'énantiosélectivité et la cinétique de l'hydrogénation en présence d'une métalloenzyme artificielle.

Dans le cas de la catalyse enzymatique, beaucoup d'enzymes peuvent être dénaturées et inactivées en présence de solvants organiques, ces différentes perturbations ont différentes origines: i) molécules d'eau dans la protéine peuvent être remplacées par du solvant et causer ainsi une déformation voir une dénaturation de la protéine, ii) le solvant peut se lier au site actif de l'enzyme et conduire à une perte d'activité, iii) dans le cas de systèmes biphasiques les tensions de surface peuvent conduire à la détérioration des structures tertiaires de la protéine.[118] Cependant dans certain cas l'utilisation de solvants organiques peut être bénéfique, la sélectivité peut être modifiée par rapport à une catalyse dans l'eau, ou alors inversée par rapport à un autre solvant organique.[119]

Le système que nous utilisons contient, mis à part l'eau, seulement 9% de DMSO nécessaires pour préparer et solubiliser le précatalyseur, le reste des réactifs se trouvant en phase aqueuse. Nous avons voulu tester dans le cas de notre métalloenzyme artificielle l'influence de solvants organiques dans des systèmes homogènes et biphasiques. En effet, si nos catalyseurs hybrides s'avèrent être efficaces en présence de solvants organiques on pourra alors envisager d'élargir notre éventail de catalyses à des substrats peu solubles dans l'eau. De plus, des systèmes biphasiques permettront de simplifier les étapes d'analyses, puisqu'on pourra directement injecter la phase organique en chromatographie en phase gazeuse et éviter ainsi les étapes d'extractions.

8.1. Effet du solvant dans un système homogène

8.1.1. Nature du solvant

Dans un premier temps nous avons voulu connaître l'effet de la nature du solvant sur nos métalloenzymes artificielles. Nous avons donc testé différents solvants comme des alcools (EtOH et MeOH) mais aussi l'acétone, le DMF et le THF dans les conditions décrites précédemment (i.e. : 9% par rapport au volume final de catalyse).

Afin de comparer les résultats d'hydrogénation du mélange d'acides *N*-α-acétamidoacrylique et *N*-α-acétamidocinnamique dans la streptavidine et dans l'avidine, nous avons choisi de travailler avec **Biot-(*R*)-Pro-1**. En effet, ce dernier étant le seul ligand capable de donner une bonne énantiosélectivité dans ces deux protéines en faveur du même énantiomère (*S*), il est un bon outil de comparaison entre l'avidine et la streptavidine .

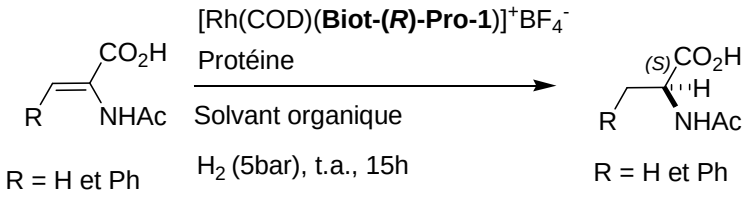


Figure 59. Hydrogénation du mélange d'acides *N*-α-acétamidoacrylique et *N*-α-acétamidocinnamique dans la streptavidine et dans l'avidine avec **Biot-(*R*)-Pro-1** en présence de différents solvants.

Les résultats montrent que quelle que soit la protéine testée le THF est le plus mauvais solvant pour notre système, puisque l'on observe une diminution drastique de l'énantiosélectivité et de la conversion de la réaction. Quant au reste des solvants les résultats restent moins bons au niveau de l'énantiosélectivité par rapport aux catalyses avec le DMSO.

	WT Avi				WT Sav			
	R = H		R = Ph		R = H		R = Ph	
	ee	Conv.	ee	Conv.	ee	Conv.	ee	Conv.
DMSO	-87	100	-89	100	-87	100	-91	100
EtOH	-82	100	-86	98	-86	100	-86	100
MeOH	-80	100	-84	99	-81	100	-83	100
Acétone	-80	100	-84	97	-81	100	-82	100
DMF	-81	100	-82	98	-87	100	-88	100
THF	-56	50	-53	15	-38	38	-44	35

Tableau 8. Les excès énantiomériques et les conversions sont en %, les valeurs négatives sont en faveur de l'énantiomère (*S*).

8.1.2. Quantité de solvant

En considérant que le DMSO est le meilleur solvant organique pour notre système, nous avons voulu savoir si un excès de ce solvant aurait des effets sur la catalyse en présence de (strept)avidine et si ce résultat dépendait de la protéine utilisée.

Comme précédemment, nous avons choisi pour ces expériences le ligand **Biot-(*R*)-Pro-1** pour l'hydrogénation du mélange d'acides *N*-α-acétamidoacrylique et *N*-α-acétamidocinnamique en présence de la WT Sav et la WT Avi.

	WT Avi				WT Sav			
	R = H		R = Ph		R = H		R = Ph	
	ee	Conv.	ee	Conv.	ee	Conv.	ee	Conv.
9 % DMSO	-87	100	-89	100	-87	100	-91	100
18 % DMSO	-87	100	-87	94	-87	100	-91	100
27 % DMSO	-86	100	-82	94	-87	100	-91	100
36 % DMSO	-82	100	-75	70	-87	100	-87	100
45 % DMSO	-75	100	-66	45	-87	100	-87	96
55 % DMSO	-66	100	-53	35	-87	100	-81	84

Tableau 9. Résultats de catalyses réalisées avec **Biot-(*R*)-Pro-1.** Les excès énantiomériques et les conversions sont en %, les valeurs négatives sont en faveur de l'énantiomère (S).

Les résultats obtenus après augmentation de la quantité de DMSO dans la catalyse (de 9% à 55%), ont montré que les catalyses effectuées dans l'avidine subissent une plus grande variation de l'excès énantiomérique et de la conversion par rapport à celles réalisées dans la streptavidine. À 55% de DMSO on forme, en présence d'avidine, quantitativement la (*S*) acétamidoalanine avec 66% ee et la (*S*) acétamidophenylalanine avec 53% ee et une conversion de 35%. Alors que dans le cas de la streptavidine on obtient (*S*) acétamidoalanine avec le même résultat qu'à 9% de DMSO et (*S*) acétamidophenylalanine avec 81% ee et une conversion de 84% (Tableau 9).

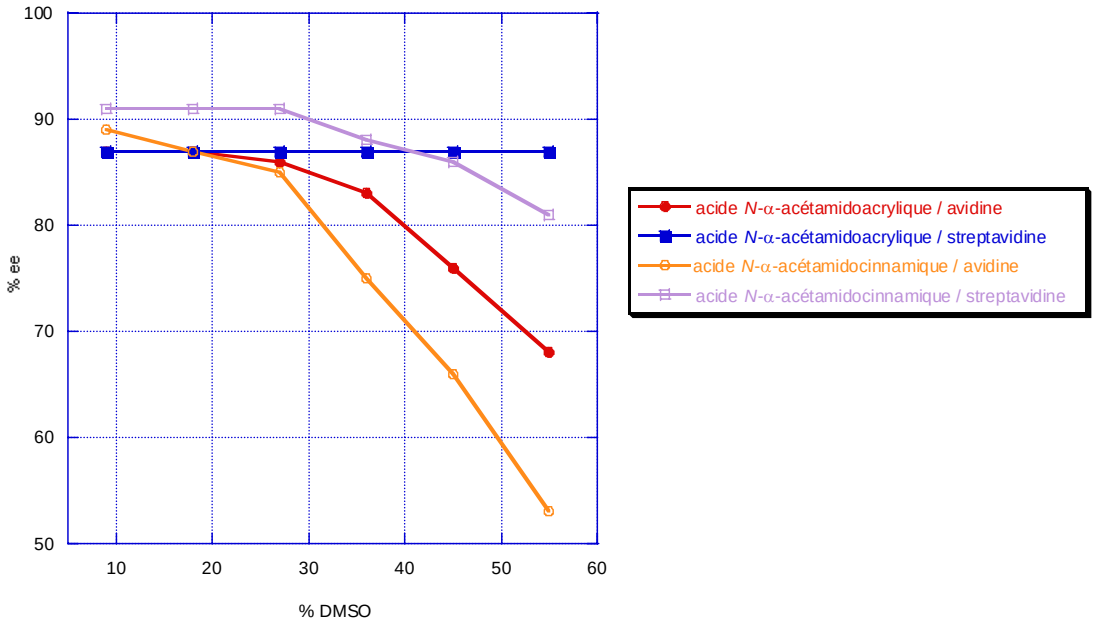


Figure 60. Effet de la quantité de DMSO sur l'énantiosélectivité de la réaction avec **Biot-(*R*)-Pro-1**, pour l'acide *N*-α-acétamidoacrylique dans la streptavidine (bleu), pour l'acide *N*-α-acétamidoacrylique dans l'avidine (rouge), pour l'acide *N*-α-acétamidocinnamique dans la streptavidine (violet), pour l'acide *N*-α-acétamidocinnamique dans l'avidine (orange).

Ces premiers résultats (Figure 60) suggèrent qu'au cours de la catalyse, la streptavidine est plus stable que l'avidine en présence d'un excès de solvant organique. En effet, contrairement à ce qu'on aurait pu penser, le pont disulfure de l'avidine ne lui apporte pas une plus grande stabilité par rapport à la streptavidine. Dans ce cas, il semble que la poche hydrophobe qui est plus profonde dans le cas de la streptavidine permet une meilleure protection du catalyseur.

De plus, les catalyses réalisées avec le ligand **Biot-1** en présence de streptavidine présentent des résultats différents de ceux obtenus avec **Biot-(*R*)-Pro-1** dans la même protéine. Puisque lorsqu'on passe de 9 à 55% de DMSO avec **Biot-1** l'excès énantiomérique de la (*R*) acétamidoalanine chute de 94% ee à 6% ee, et celui de (*R*) acétamidophenylalanine de 94% ee et 85% de conversion à 14% ee et 28% de conversion (Tableau 10).

	WT Sav			
	R = H		R = Ph	
	ee	Conv.	ee	Conv.
9 % DMSO	94	100	94	85
18 % DMSO	90	100	88	90
27 % DMSO	81	100	80	80
36 % DMSO	52	80	60	58
45 % DMSO	15	72	23	25
55 % DMSO	6	100	14	28

Tableau 10. Résultats de catalyses réalisées avec **Biot-1.** Les excès énantiomériques et les conversions sont en %, les valeurs présentées sont en faveur de l'énantiomère (*R*).

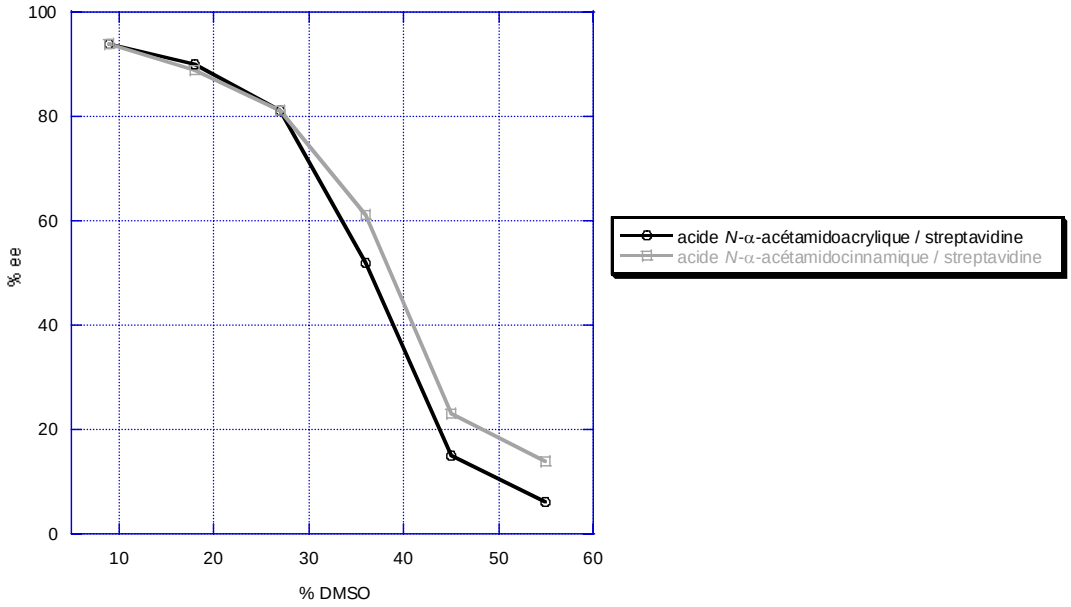


Figure 61. Effet de la quantité de DMSO sur l'énantiosélectivité de la réaction avec Biot-1, pour l'acide *N*-α-acétamidoacrylique dans la streptavidine (gris), pour l'acide *N*-α-acétamidocinnamique dans la streptavidine (noir).

D'après ces résultats (Figure 61), il semble que la position du ligand dans la cavité protéique joue un rôle important sur l'efficacité de la métalloenzyme. En effet, l'introduction d'une proline comme espaceur entre la biotine et l'aminodiphosphine **1** conduit probablement à un repliement de la structure et permet ainsi d'avoir un ligand beaucoup plus protégée dans la poche hydrophobe de la protéine par rapport à **Biot-1**. Une augmentation de la quantité de solvant organique peut donc perturber de manière plus significative l'environnement autour du [Rh(COD)(**Biot-1**)]$^+$ par rapport à celui de [Rh(COD)(**Biot-(R)-Pro-1**)]$^+$.

8.2. Effet du solvant dans un système biphasique

En complément à cette étude, nous avons voulu testé un système biphasique où le substrat se trouve en phase organique (acétate d'éthyle) et la métalloenzyme artificielle en phase aqueuse.

Les résultats obtenus pour les catalyses effectuées avec les ligands **Biot-1** et **Biot-(R)-Pro-1** en présence de streptavidine et **Biot-1** en présence d'avidine, montrent non seulement que la catalyse peut être efficace dans ces conditions mais aussi que, comme dans le cas d'un excès de DMSO, le système **Biot-(*R*)-Pro-1** ⊂ Streptavidine est plus stable et plus efficace que **Biot-(*R*)-Pro-1** ⊂ Avidine et que **Biot-1** ⊂ Streptavidine.

En effet, dans le cas de **Biot-(*R*)-Pro-1** en présence de Streptavidine, on observe une diminution par rapport aux conditions standards de seulement - 3 à - 4 % pour l'excès énantiomérique et jusqu'à -10% pour la conversion. Alors qu'avec **Biot-1** cette diminution est beaucoup plus importante, puisqu'on observe non seulement une diminution de l'éxcès énantiomérique, mais aussi de la conversion de la réaction principalement dans le cas de l'acide *N*-α-acétamidocinnamique (Tableau 11).

	Acétamidoalanine		Acétamidophenylalanine	
	ee	Conv.	ee	Conv.
Biot-(*R*)-Pro-1 ⊂ Streptavidine	-83	96	-88	90
Biot-(*R*)-Pro-1 ⊂ Avidine	-77	82	-86	28
Biot-1 ⊂ Streptavidine	44	44	38	13

Tableau 11. Les excès énantiomériques et les conversions sont en %, les valeurs positives de ee sont en faveur de l'énantiomère (*R*) et les valeurs négatives sont en faveur de l'énantiomère (*S*).

Ces derniers résultats confirment à leur tour que la position du ligand dans la poche protéique joue un rôle important dans l'efficacité de la catalyse. Actuellement des études sont en cours au laboratoire pour la détermination des structures de ces ligands biotinylés dans la (strept)avidine, ainsi il sera possible de mieux comprendre le comportement de nos métalloenzymes artificielles durant la catalyse.

VII. Conclusion

En conclusion, en nous basant sur la technologie biotine-(strept)avidine nous avons créé des métalloenzymes artificielles capables de combiner les propriétés de la catalyse chimique en phase homogène et de la catalyse enzymatique. En effet, grâce à l'optimisation chimique nous avons synthétisé et testé 26 ligands biotinylés pour l'hydrogénation d'oléfines prochirales. Ces catalyseurs hybrides ont permis de produire les deux énantiomères des produits d'hydrogénation, avec quasiment aucune discrimination vis-à-vis du substrat utilisé (l'acide *N*-α-acétamidoacrilique et l'acide *N*-α-acétamidocinnamique). L'optimisation génétique a, quant à elle, permis de tester cinq nouvelles protéines et de modifier ainsi la seconde sphère de coordination responsable de l'énantiosélectivité de ces catalyseurs. Ces métalloenzymes artificielles se sont avérées non seulement des systèmes efficaces pour l'hydrogénation énantiosélective en phase aqueuse, mais elles présentent aussi une certaine stabilité en présence de solvant organique et en milieu biphasique.

Le criblage des sept protéines (des deux protéines wild type et des cinq mutants) avec les 18 ligands biotinylés avec espaceurs achiraux, a montré que la meilleure combinaison protéine-ligand produit la (*R*)-*N*-acétamidoalanine (96 % ee dans la S112G avec **Biot–1**) ou (*S*)-acétamidoalanine (80 % ee dans l'avidine avec **Biot–3^{1}–2**; 57 % ee dans S112G avec **Biot–4^{ortho}–2**). A partir de ces résultats, nous avons pu observer que les positions S112 et V47 dans la streptavidine sont sensibles aux mutations; et que les ligands biotinylés **Biot–1**, **Biot–3^{1}–2**, **Biot–3^{1}–1**, **Biot–3^{2}–1** et **Biot–4^{ortho}–2** montrent de grandes variabilités au niveau des excès énantiomériques par rapport aux autres ligands.

Le criblage des deux protéines protéines wild type avec les 8 ligands biotinylés contenant des espaceurs chiraux, a montré que l'introduction d'aminoacides de configuration (*R*) ou (*S*)

comme espaceurs permet de former chacun des deux énantiomères : (*R*)-*N*-acétamidoalanine (65 % ee dans la streptavidine avec **Biot-(*R*)-Phe-1**) et la (*S*)-*N*-acétamidoalanine (73 % ee dans la streptavidine avec **Biot-(*S*)-Phe-1**). De plus, en employant le ligand **Biot-(*R*)-Pro-1** nous avons réussi à obtenir pour la première fois la meilleurs énantiosélectivité en faveur de l'énantiomère (*S*) dans l'avidine et la streptavidine (jusqu'à 89% ee dans la streptavidine et 91% ee dans l'avidine).

Les études plus approfondies avec [Rh (COD) (**Biot-1**)]$^{+}BF_4^{-}$ et [Rh (COD) (**Biot-(*R*)-Pro-1**)]$^{+}BF_4^{-}$ dans la streptavidine, et [Rh (COD) (**Biot-(*R*)-Pro-1**)]$^{+}BF_4^{-}$ dans l'avidine ont montré que:

i) Les catalyses effectués en présence de streptavidine sont 2.3 fois plus rapides que celles réalisées sans protéine.

ii) Les conditions de température optimales pour l'hydrogénation, en présence de protéine, sont comprises entre 20°C ≤ T ≤30°C.

iii) L'effet des solvants organiques sur nos métalloenzymes artificielles dépend principalement de la position du ligand dans la protéine. Ainsi **Biot-(*R*)-Pro-1** s'avère être un ligand de choix pour réaliser des catalyses en présence d'une grande quantité de solvant organique et en milieu biphasique.

Ces catalyseurs hybrides offrent des perspectives intéressantes en vue d'une chimie verte puisque notre système s'avère être très efficace en milieu aqueux. Nous pouvons ainsi envisager de développer ces métalloenzymes artificielles à d'autres types de réaction, en faisant varier le catalyseur organométallique accroché à la biotine, il serait possible d'envisager la réduction de cétones[120], d'imines ou alors d'effectuer des réactions d'oxydations sur différents substrats.

De plus, nous pouvons imaginer le recyclage du catalyseur soit par immobilisation sur support, ou alors en en exploitant l'efficacité de nos métalloenzymes artificielles en milieu biphasique. De plus, cette dernière technique permettrait d'élargir notre éventail de substrats et simplifiera le traitement de la réaction et les conditions d'analyses.

VIII. Partie expérimentale

1. General

1.1. Reagents and solvents

Substance	Origin	Purity
(+)-Biotin	Chanzhou Huaren	≥ 99%
2,3,4,5,6-pentafluorophenol	Fluka	≥ 99%
1.3-dicyclohexylcarbodiimide	Aldrich	≥ 99%
2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine	Aldrich	≥ 97%
N-Methylmorpholine	Fluka	≥ 98%
N-N-Diisopropylethylamine	Fluka	≥ 98%
Trifluoroacetic acid	Fluka	≥ 98%
Boc-(L)Phe-OH	Fluka	≥ 99%
Boc-(D)Phe-OH	Fluka	≥ 99%
Boc-(L)Pro-OH	Fluka	≥ 99%
Boc-(D)Pro-OH	Fluka	≥ 99%
Anisole	Fluka	≥ 99%
Sodium hydride	Aldrich	60% dispersion in mineral oil
4,6-Bis(diphenylphosphino)phenoxazine	Strem	≥ 98%
N-Acetamidoacrylic acid	Acros	≥ 99%
N-Acetamidocinnamic acid	Fluka	≥ 99%
Trimethylsulfonium hydroxide	Fluka	0.25M in MeOH
DMSO	Acros	99.9%
DMF	Fluka	≥ 99.5% (H_2O ≤ 0.005%)
Acétonitrile	Romil Chemicals	≥ 99.9%
ETOH	Merck	≥ 99.9%
MeOH	Riedel-de-Haën	≥ 99.8% (H_2O ≤ 0.005%)
Acetone	Fluka	≥ 99.8%
THF	-	Distilled on Na/benzophenone
Ethyl acetate	-	Distilled on CaH_2
H_2O	-	MilliQ
$Rh(COD)_2BF_4$	Umicore	-
Phosphate buffer pH 7.0	Merck	-
Avidin	Belovo	-
Streptavidin	Own production	-

1.2. Chromatography

TLC (Thin Layer Chromatography) was performed on 0.2 mm silica gel 60 F254 aluminium sheets from Merck. All biotinylated compounds were revealed as red spots with a solution of DACA (4-dimethylaminocinnamaldehyde) in methanol containing 1% conc. H_2SO_4.

Column chromatography was carried out on silica gel 60 Å, 32-63μm from Brunschwig. All steps (including purification) involving phosphines were performed under a nitrogen atmosphere using standard Schlenk techniques.

Gas chromatography (GC) was performed on Agilent 6890 series instrument on split mode. The hydrogenation products were converted in situ to their methyl esters with trimethylsulfonium hydroxyde[121]. The enantiomeric exces (ee) was determined on chiral columns :

- Heptakis-2,3,6-perethyl-*β*-cyclodextrin, 22 m x 0.32 mm column: He carrier gas: 3.3 ml/min, inlet injector 280°C, oven 97 °C, FID detector 230 °C; retention time: Methyl *N*-acetylacetamidoacrylate: 4.3 min, Methyl (*S*)-*N*-acetylacetamidoalanine: 4.6 min, Methyl (*R*)-*N*-acetylacetamidoalanine: 5 min.
- Permabond-*L*-Chirasyl-Val (Macheray-Nagel), 25 m x 0.25 mm column: He carrier gas: 1.2 bar, inlet injector 280°C, oven (85°C; 10 min, 8°C/min; 135°C; 0 min, 10°C/min; 180°C; 35min), FID detector 200 °C; retention time: Methyl *N*-acetylacetamidoacrylate: 5.8 min, Methyl (*R*)-*N*-acetylacetamidoalanine: 11.3 min, Methyl (*S*)-*N*-acetylacetamidoalanine: 12.8 min, Methyl (*R*)-*N*-acetylacetamidophenylalanine: 24.1 min, Methyl (*S*)-*N*-acetylacetamidophenylalanine: 24.7 min, Methyl *N*-acetylacetamidocinnamate: 34.2 min.

1.3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

^{1}H, ^{13}C and ^{31}P spectra were obtained on a Bruker 400 and 500 MHz spectrometer. The ^{1}H, ^{13}C assignements are based on COSY, DEPT and HETCOR experiments. Chemical shifts are reported in ppm (parts per million), relative to external standards TMS (^{1}H, ^{13}C) and H_3PO_4 ^{31}P). The samples were measured in deuterated chloroform (99.8% D) and deuterated dimethylsulfoxide (99.5% D) from Cambridge Isotope Laboratories. Signals were quoted as s (singulet), d (doublet), t (triplet), br (broad), and m (multiplet).

1.4. Mass Spectrometry

Electro-Spray Ionization Mass Spectra (ESI-MS) were recorded on a Finnigan spectrometer using an ion trap. The relative intensities are given in parenthesis (%). The presence of oxidized forms of diphosphine ligands in mass spectra is due to their oxydation during the measurement.

1.5. Catalysis glasses and equipment

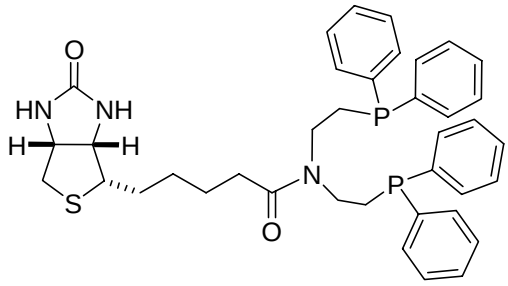
All operations were performed in a glove box. Catalysis reactions were performed in Pyrex tubes (volume ca. 3 mL). These tubes were placed in an autoclave that contains 21 wells, and stirred on an orbital shaker (200 rpm).

1.6. Buffers

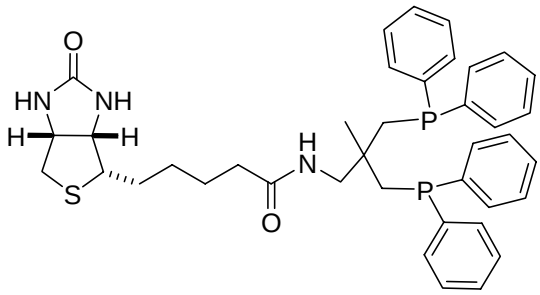
For each buffer the corresponding acid was dissolved in water and the pH was adjusted with NaOH pellets to obtain 1M of stock-solution. The buffer prepared and used for catalysis were:

- Acetate, pH 4.0.
- MES: 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid sodium salt, pH 5.5.
- MOPS: 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid sodium salt, pH 7.0.

2. Synthesis of biotinylated amidodiphosphine Biot–1 and Biot–2.



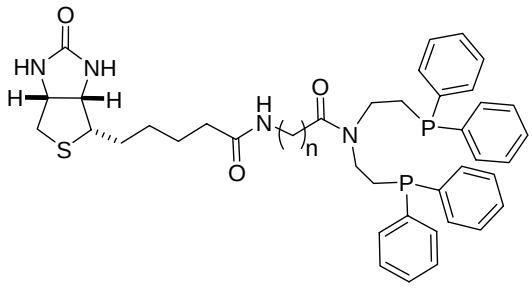
Biot-1



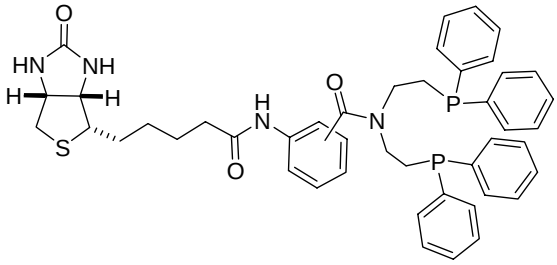
Biot-2

Biot-1 or **Biot-2** were prepared by the coupling of biotin N-hydroxysuccinimide (**Biot**NHS) and **H–1** HCl or **H–2** according to the litterature[93,114,122].

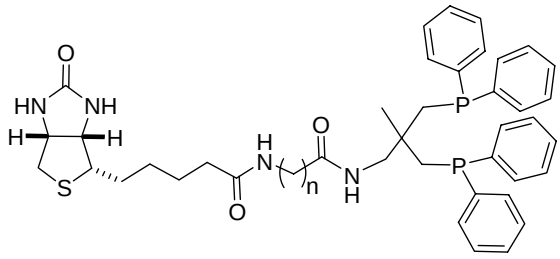
3. Synthesis of biotinylated amidodiphosphine ligands with 3^n or 4^q spacers



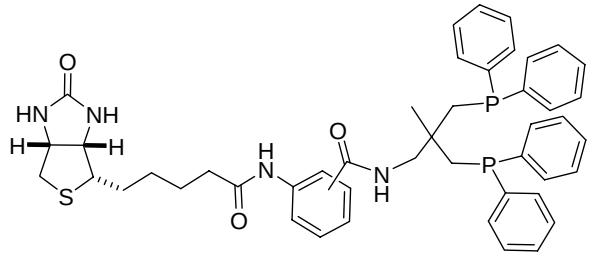
Biot-3^n-1
n = 1-5



Biot-4^q-1
q = *ortho*-, *meta*- and *para*-



Biot-3^n-2
n = 1-5



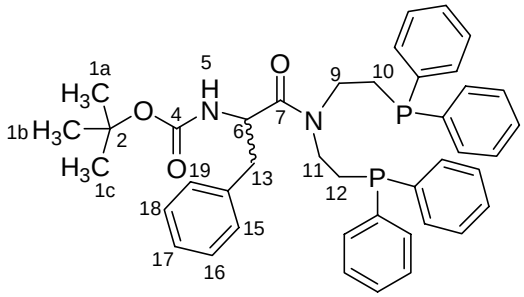
Biot-4^q-2
q = *ortho*-, *meta*- and *para*-

Biot-3^n-1, Biot-4^q-1, Biot-3^n-2, Biot-4^q-2 (n=1-5, q=*ortho*-, *meta*- and *para*-) or **Biot-2** were prepared according to the literature[114,122], by the coupling between biotinylated aminoacid (**Biot-3^n** or **Biot-4^q** (n=1-5, q=*ortho*-, *meta*- and *para*-)) and diphosphino-amine (**H–1** HCl or **H–2**).

4. Synthesis of Boc-Amino acid Diphosphine Precursors

4.1. General Procedure for the Synthesis of Boc-Phe-1

The diphosphino-amine **H–1** HCl (0.10 g, 0.21 mmol), Boc-Phe-OH (0.05 g, 0.21 mmol) and CDMT (0.04 g, 0.23 mmol) were mixed in degassed acetonitrile (10 ml) and *N*-methylmorpholine (0.06 ml, 0.52 mmol) was added slowly. The slurry was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Hexane/AcOEt : 9/1 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam. (yield: 0.09g, 0.13mmol, 61%).



^{1}H NMR (500.00 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 1.4 (s, 9H; **H^{1a}**, **H^{1b}**, **H^{1c}**), 1.8 (m, 1H; **H^{10}**), 2.0 (m, 1H; **H^{12}**), 2.2 (m, 2H; **H^{10}**, **H^{12}**), 2.8 (m, 2H; **H^{13}**), 2.9 (m, 2H; **H^{9}**), 3.0 (m, 1H; **H^{11}**), 3.5 (m, 1H; **H^{11}**), 4.6 (dd, 1H, *J* = 15.6, 8; **H^{6}**), 5.3 (d, 1H, *J* = 8.5; **H^{5}**), 7.0 (m, 2H; **H^{15}, H^{19}**), 7.1 (m, 3H; **H^{16}**, **H^{17}**, **H^{18}),** 7.3-7.4 (m, 20H; **PhH**).

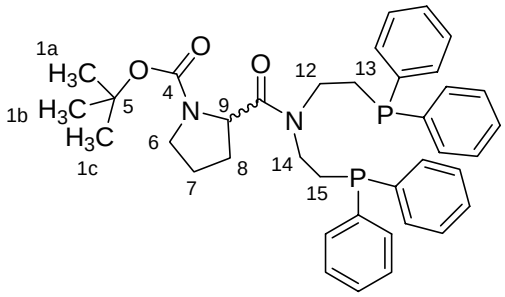
^{13}C NMR (125.70 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 26.0 (C10), 27.4 (C12), 28.3 (C1), 40.3 (C13), 44.2 (C9), 44.8 (C11), 51.4 (C6), 79.5 (C2), 128.8-133.6 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 154.8 (C4), 171.3 (C7).

^{31}P NMR (161.98 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ = -19.8, -20.7.

ESI MS for $C_{42}H_{46}N_2O_3P_2$ (688.3): 705.2 (32) $[M+H+O]^+$, 689.2 (55) $[M+H]^+$, 721.1 (100) $[M+H+2O]^+$.

4.2. General Procedure for the Synthesis of Boc-Pro-1

The diphosphino-amine **H–1** HCl (0.10 g, 0.21 mmol), Boc-Pro-OH (0.05 g, 0.21 mmol) and CDMT (0.04 g, 0.23 mmol) were mixed in degassed acetonitrile (10 ml) and *N*-methylmorpholine (0.06 ml, 0.52 mmol) was added slowly. The slurry was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Hexane/AcOEt : 8/2 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam. (yield: 0.10g, 0.16mmol, 75%).



^{1}H NMR (500.00 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 1.4 (s, 5H; **H^{1}**)*, 1.7 (s, 4H; **H^{1}**)*, 1.6-1.9 (m, 4H; **H^{7}**, **H^{8}**), 2.2-2.5 (m, 4H; **H^{13}**, **H^{15}**), 3.2 (m, 6H; **H^{6}**, **H^{12}**, **H^{14}**), 3.9-4.1 (m, 1H; **H^{9}**) *, 7.3-7.4 (m, 20H; **PhH**).

^{13}C NMR (125.70 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 23.3 (C7), 26.4 (C13), 26.8 (C15), 28.5 (C1), 29.9 (C8), 44.3 (C12), 44.9 (C14), 56.5 (C9), 79.2 (C2), 128.8-133.6 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 153.7 (C4), 172.0 (C10).

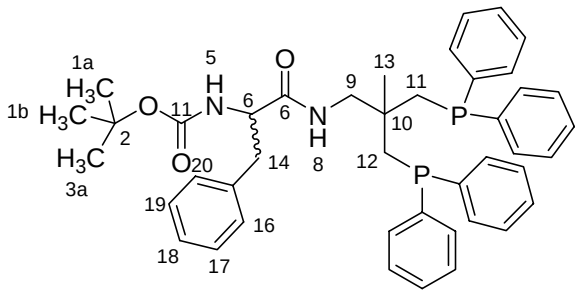
^{31}P NMR (161.98 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): -19.4*, -20.0*, -20.4*, -20.9*.

ESI MS for $C_{38}H_{44}N_2O_3P_2$ (638.28): 655.2 (25) $[M+H+O]^+$, 639.2 (43) $[M+H]^+$, 671.1 (100) $[M+H+2O]^+$.

* Two diastereomeric configurations.

4.3. General Procedure for the Synthesis of Boc-Phe-2

The diphosphino-amine **H–2** (0.52 g, 1.10 mmol), Boc-Phe-OH (0.30 g, 1.10 mmol) and CDMT (0.22 g, 1.20 mmol) were mixed in degassed acetonitrile (15 ml) and *N*-methylmorpholine (0.31 ml, 2.83 mmol) was added slowly. The slurry was stirred 48h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Hexane/AcOEt : 8/2 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam. (yield: 0.15g, 0.22mmol, 20%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 0.8 (s, 3H; **H^{13}**), 1.4 (s, 9H; **H^{1a}, H^{1b}**, **H^{1c}**), 2.2 (m, 4H; **H^{11}**, **H^{12}**), 2.9 (m, 2H; **H^{14}**), 3.2 (m, 2H; **H^{9}**), 4.0 (m, 1H; **H^{6}**), 4.8 (br, 1H; **H^{5}**), 5.3 (br, 1H; **H^{8}**), 7.0 (m, 2H; **H^{16}, H^{20}**), 7.1 (m, 3H; **H^{17}**, **H^{18}**, **H^{19}),** 7.3-7.4 (m, 20H; **PhH**).

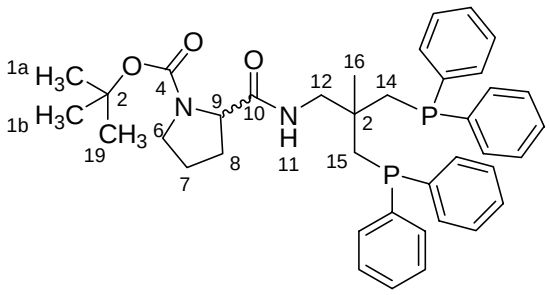
^{13}C NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 26.3 (C13), 28.7 (C1), 38.9 (C14), 39.5 (C11), 39.7 (C12), 49.4 (C9), 56.4 (C6), 80.3 (C2), 128.8-133.6 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 155.5 (C4), 171.6 (C7). The quaternary carbon (C10) could not be unambiguously assigned.

^{31}P NMR (161.98 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = -25.6, -25.7.

ESI MS for $C_{43}H_{48}N_2O_3P_2$ (702.31): 741.2 (10) $[M+Na+O]^+$, 725.3 (100) $[M+Na]^+$.

4.4. General Procedure for the Synthesis of Boc-Pro-2

The diphosphino-amine **H–2** (0.64 g, 1.40 mmol), Boc-Pro-OH (0.30 g, 1.40 mmol) and CDMT (0.27 g, 1.50 mmol) were mixed in degassed acetonitrile (15 ml) and *N*-methylmorpholine (0.38 ml, 3.50 mmol) was added slowly. The slurry was stirred 48h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Hexane/AcOEt : 8/2 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam. (yield: 0.17g, 0.27mmol, 19%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 0.9 (s, 3H; **H^{16}**), 1.7 (m, 9H; **H^{1a}, H^{1b}**, **H^{1c}**), 1.7-2.4 (m, 8H; **H^{7}**, **H^{8}, H^{14}**, **H^{15}**), 3.2 (m, 4H; **H^{6}**, **H^{12}**), 4.1 (m, 1H; **H^{9}**), 5.9 (br, 1H; **H^{11}**), 6.7 (br, 1H; **H^{11}**), 7.3-7.4 (m, 20H; **PhH**).

^{13}C NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 24.0 (C7), 25.4 (C16), 27.9 (C1), 29.2 (C8), 38.9 (C14), 39.1 (C15), 46.6 (C6), 48.6 (C12), 59.7 (C9), 80.3 (C2), 128.8-132.7 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 155.5 (C4), 171.6 (C10). The quaternary carbon (C13) could not be unambiguously assigned.

^{31}P NMR (161.62 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = -25.1*, -25.3*, -25.6*.

ESI MS for $C_{39}H_{46}N_2O_3P_2$ (652.3) : 669.1 (15) $[M+H+O]^+$, 653.2 (100) $[M+H]^+$.

* Diastereomeric configurations.

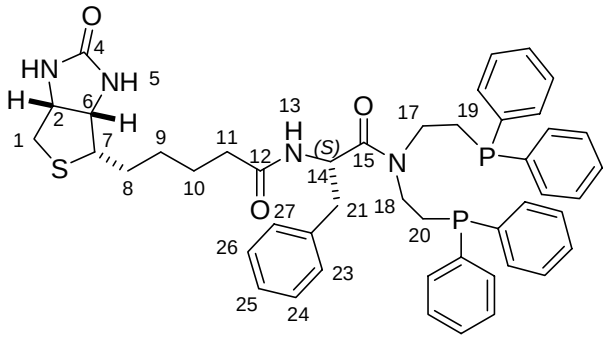
5. Deprotection of Boc-Amino acid Diphosphine; general procedure:

The Boc protecting group was removed from **Boc-AA-NP_2** (**AA**= **Phe** or **Pro** and NP_2= **1** or **2**) with 20 equiv TFA in dichloromethane (TFA/DCM : 1/2) and 2 equiv of anisole. The mixture of TFA/DCM/Anisole was degassed for 10 min. before adding the Boc-amino acid diphosphine precursors. The reaction was completed after 3 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was used for the synthesis of the biotinylated ligands.

6. Synthesis of biotinylated amidodiphosphine ligands with Phe or Pro spacers

6.1. Biot-(*S*)-Phe-1

N-*N*-Diisolpropylethylamine (0.11 ml, 0.68 mmol) was added to a solution containing Biot-OC_6F_5 (0.07 g, 0.17 mmol) and the deprotected amino acid diphosphine H-(*S*)-Phe-1 (0.17 mmol) in DMF (10 ml). The mixture was stirred 48 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Chloroform/MeOH: 25/1 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam (yield: 0.05g, 0.06mmol, 34%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 1.3 (m, 2H; **H^{9}**, **H^{8}**), 1.6 (m, 4H; **H^{8}**, **H^{9}**, **H^{10}**), 1.8 (m, 1H; **H^{19}**), 2.0 (m, 1H; **H^{20}**), 2.2 (m, 3H; **H^{11}**, **H^{20}**), 2.4 (m, 1H; **H^{19}**), 2.7 (d, 1H, *J* = 12.8; **H^{1}**), 2.8 (m, 3H; **H^{1}**, **H^{21}**), 3.0 (m, 1H; **H^{18}**), 3.1 (m, 3H; **H^{17}**, **H^{7}**), 3.5 (m, 1H; **H^{18}**), 4.3 (dd, 1H, *J* = 8.0, 4.8; **H^{6}**), 4.5 (m, 1H; **H^{2}**), 4.8 (dd, 1H, *J* = 8.0, 7.6; **H^{14}**), 6.9 (m, 2H; **H^{23}, H^{27}**), 7.1 (m, 3H; **H^{24}**, **H^{25}**, **H^{26}**), 7.3-7.4 (m, 20H; **PhH**), 7.7 (br, 1H; **H^{13}**).

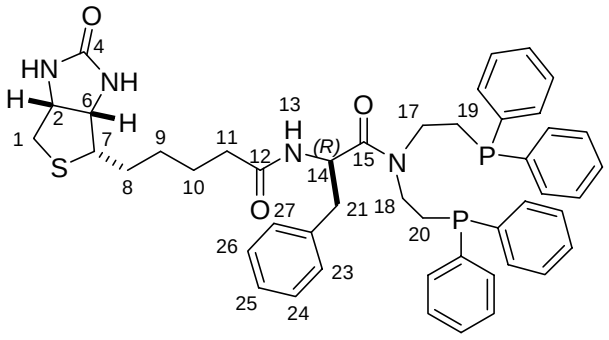
^{13}C NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 26.0 (C10), 26.6 (C20), 27.5 (C19), 28.2 (C8), 28.4 (C9), 35.9 (C11), 39.4 (C21), 40.7 (C1), 44.6 (C18), 45.7 (C17), 50.7 (C14), 55.8 (C7), 60.8 (C2), 62.5 (C6), 128.8-133.6 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 165.0 (C4), 172.5 (C15), 173.4 (C12).

^{31}P NMR (161.98 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = -20.4.

ESI MS for $C_{47}H_{52}N_4O_3P_2S$ (814.3): 869.5 (22) $[M+Na+2O]^+$, 853.3 (30) $[M+Na+O]^+$, 837.4 (100) $[M+Na]^+$.

6.2. Biot-(*R*)-Phe-1

N-*N*-Diisolpropylethylamine (0.35 ml, 2.10 mmol) was added to a solution containing Biot-OC_6F_5 (0.22 g, 0.53 mmol) and the deprotected amino acid diphosphine H-(*R*)-Phe-1 (0.53 mmol) in DMF (10 ml). The mixture was stirred 48 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Chloroform/MeOH: 25/1 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam (yield: 0.17g, 0.21mmol, 40%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 1.2-1.3 (m, 2H; **H^{9}**, **H^{8}**), 1.5-1.8 (m, 4H; **H^{8}**, **H^{9}**, **H^{10}**), 1.9 (m, 1H; **H^{19}**), 2.0-2.2 (m, 4H; **H^{11}**, **H^{20}**), 2.5 (m, 1H; **H^{19}**), 2.7 (d, 1H, *J* = 12.8; **H^{1}**), 2.8 (m, 3H; **H^{1}**, **H^{21}**), 3.0 (m, 1H; **H^{18}**), 3.1 (m, 2H; **H^{17}**), 3.3 (m, 1H; **H^{7}**), 3.5 (m, 1H; **H^{17}**), 4.2 (dd, 1H, *J* = 8.0, 4.8; **H^{6}**), 4.4 (m, 1H; **H^{2}**), 4.9 (dd, 1H, *J* = 8.0, 7.6; **H^{14}**), 6.9 (m, 2H; **H^{23}, H^{27}**), 7.1 (m, 3H; **H^{24}**, **H^{25}**, **H^{26}),** 7.3-7.4 (m, 20H; **PhH**) , 8.0 (d, 1H, *J* = 8.0; **H^{13}**).

^{13}C NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 26.0 (C10), 26.6 (C20), 27.7 (C19), 27.8 (C8), 28.1 (C9), 35.6 (C11), 39.0 (C21), 41.0 (C1), 44.6 (C18), 45.6 (C17), 50.5 (C14), 56.0 (C7), 60.8 (C2), 62.0 (C6), 128.8-133.6 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 165.2 (C4), 172.8 (C15), 173.8 (C12).

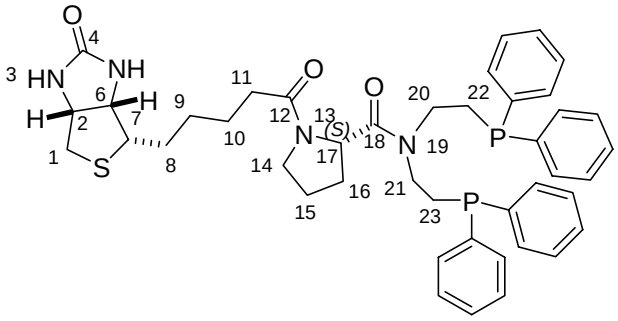
^{31}P NMR (161.98 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = -20.1, -20.3.

ESI MS for $C_{47}H_{52}N_4O_3P_2S$ (814.3): 869.5 (10) [M+Na+2O]+, 853.3 (18) [M+Na+O]+, 837.5 (100) [M+Na]+.

6.3. Biot-(*S*)-Pro-1

N-*N*-Diisolpropylethylamine (0.11 ml, 0.68 mmol) was added to a solution containing Biot-OC_6F_5 (0.07 g, 0.17 mmol) and the deprotected amino acid diphosphine H-(*S*)-Pro-1 (0.17 mmol) in DMF (10 ml). The mixture was stirred 48 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica

gel 60 F254 using Hexane/EtOH: 8/2 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam (yield: 0.07g, 0.09mmol, 54%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 1.4-1.5 (m, 2H; **H^{10}**, **H^{9}**), 1.6-1.8 (m, 7H; **H^{8}**, **H^{15}**, **H^{16}**, **H^{10}**, **H^{9}**), 2.1 (m, 1H; **H^{15}**), 2.2-2.4 (m, 5H; **H^{22}**, **H^{23}**, **H^{11}**), 2.5 (m, 1H; **H^{23}**), 2.7 (d, 1H, *J* = 12.8; **H^{1}**), 2.8 (dd, 1H, *J* = 12.8, 4.8; **H^{1}**), 3.1 (m, 1H; **H^{7}**), 3.2-3.4 (m, 3H; **H^{20}**, **H^{21}**), 3.5 (m, 1H; **H^{14}**), 3.5-3.7 (m, 2H; **H^{21}, H^{14}**), 4.2 (m, 2H; **H^{6}, H^{17}**), 4.4 (m, 1H; **H^{2}**), 5.4 (br, 1H; **biotin NH**), 6.3 (br, 1H; **biotin NH**), 7.3-7.4 (m, 20H; **PhH**).

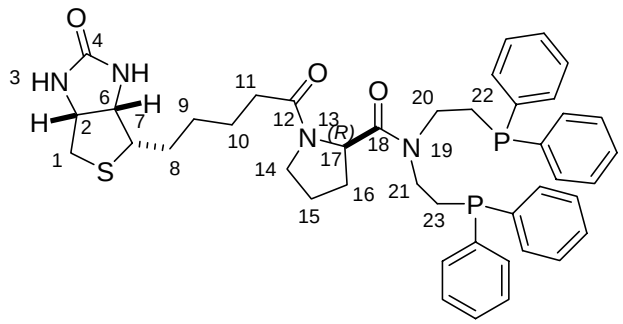
^{13}C NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 24.9 (C15), 26.8 (C23), 27.0(C22), 27.9 (C8), 28.5 (C9), 28.8 (C10), 29.4 (C16), 33.9 (C11), 40.9 (C1), 44.6 (C20), 45.5 (C21), 48.0 (C14), 56.0 (C7), 57.1 (C17), 60.6 (C2), 62.1 (C6), 128.8-133.6 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 164.1 (C4), 171.9 (C18), 172.0 (C12).

^{31}P NMR (161.98 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = -19.7, -20.5.

ESI MS for $C_{43}H_{50}N_4O_3P_2S$ (764.3): 819.3 (20) [M+Na+2O]+, 803.4 (35) [M+Na+O]+, 787.5 (100) [M+Na]+.

6.4. Biot-(*R*)-Pro-1

N-*N*-Diisolpropylethylamine (0.44 ml, 2.68 mmol) was added to a solution containing Biot-OC_6F_5 (0.28 g, 0.67 mmol) and the deprotected amino acid diphosphine H-(*R*)-Pro-1 (0.67 mmol) in DMF (10 ml). The mixture was stirred 48 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Hexane/EtOH: 8/2 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam (yield: 0.29g, 0.39mmol, 58%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 1.3-1.4 (m, 2H; **H^{10}**, **H^9**), 1.6-1.8 (m, 7H; **H^8**, **H^{15}**, **H^{16}**, **H^{10}**, **H^9**), 2.0 (m, 1H; **H^{15}**), 2.1-2.3 (m, 4H; **H^{22}**, **H^{23}**, **H^{11}**), 2.4-2.6 (m, 4H; **H^{23}**, **H^1**, **H^{11}**), 3.0 (m, 1H; **H^7**), 3.1 (m, 1H; **H^{20}**), 3.3 (m, 2H; **H^{21}**), 3.4 (m, 1H; **H^{14}**), 3.6 (m, 1H; **H^{20}**), 3.8 (m, 1H; **H^{14}**), 4.2 (m, 2H; **H^6, H^2**), 4.4 (m, 1H; **H^{17}**), 5.4 (br, 1H; **biotin NH**), 6.3 (br, 1H; **biotin NH**), 7.3-7.4 (m, 20H; **PhH**).

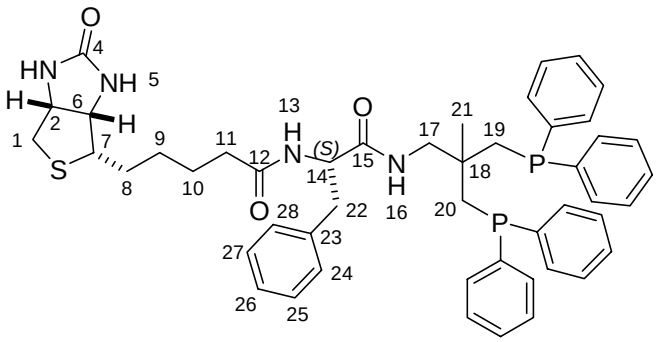
^{13}C NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 24.9 (C15), 26.8 (C23), 27.0(C22), 27.9 (C8), 28.5 (C9), 28.8 (C10), 29.4 (C16), 33.9 (C11), 40.9 (C1), 44.6 (C20), 45.5 (C21), 48.0 (C14), 56.0 (C7), 57.1 (C17), 60.6 (C2), 62.1 (C6), 128.8-133.6 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 164.1 (C4), 171.9 (C18), 172.0 (C12).

^{31}P NMR (161.98 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = -19.8, -20.4.

ESI MS for $C_{43}H_{50}N_4O_3P_2S$ (764.3): 781.3 (10) $[M+H+O]^+$,765.3 (100) $[M+H]^+$.

6.5. Biot-(*S*)-Phe-2

N-*N*-Diisolpropylethylamine (0.09 ml, 0.56 mmol) was added to a solution containing Biot-OC_6F_5 (0.06 g, 0.14 mmol) and the deprotected amino acid diphosphine H-(*S*)-Phe-2 (0.14 mmol) in DMF (7 ml). The mixture was stirred 24 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Chloroform/EtOH: 28/1 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam (yield: 0.07g, 0.08mmol, 58%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 0.9 (s, 3H; **H^{21}**), 1.2-1.6 (m, 6H; **H^9**, **H^8,** **H^{10}**), 1.9 (m, 2H; **H^{11}**), 2.3-2.4 (m, 4H; **H^{19}**, **H^{20}**), 2.6 (d, 1H, *J* = 12.8; **H^1**), 2.8 (dd, 1H, *J* = 12.8, 4.8 ; **H^1**), 2.9-3.1 (m, 4H; **H^{22}**, **H^7**, **H^{17}**), 3.3 (m, 1H; **H^{17}**), 4.1 (m, 1H; **H^6**), 4.4 (m, 1H; **H^2**), 4.6 (m, 1H; **H^{14}**), 5.7 (br; **biotin NH**), 6.5 (m, 1H; **H^{16}**), 7.1-7.5 (m, 25H; **PhH**), 8.2 (br, 1H; **H^{13}**).

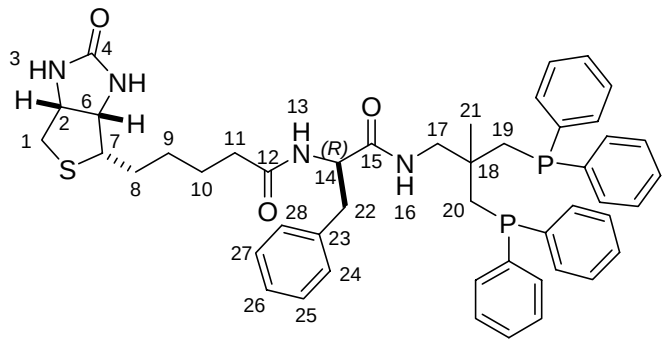
^{13}C NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 25.3 (C10), 26.2 (C21), 28.1 (C8), 28.3 (C9), 31.4 (C18), 35.2 (C11), 38.6 (C22), 39.6 (C19), 39.7 (C20), 40.8 (C1), 49.7 (C17), 55.1 (C14), 56.3 (C7), 60.6 (C2), 62.5 (C6), 128.8-133.6 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 164.7 (C4), 172.8 (C15), 173.7 (C12).

^{31}P NMR (161.98 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = -25.5, -25.6.

ESI MS for $C_{48}H_{54}N_4O_3P_2S$ (828.3): 829.3 (100) $[M+H]^+$.

6.6. Biot-(*R*)-Phe-2

N-*N*-Diisolpropylethylamine (0.08 ml, 0.51 mmol) was added to a solution containing Biot-OC_6F_5 (0.05 g, 0.13 mmol) and the deprotected amino acid diphosphine H-(*R*)-Phe-2 (0.13 mmol) in DMF (7 ml). The mixture was stirred 24 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Chloroform/EtOH: 28/1 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam (yield: 0.05g, 0.06mmol, 47%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 0.8 (s, 3H; **H^{21}**), 1.2-1.6 (m, 6H; **H^9**, **H^8,** **H^{10}**), 1.9 (m, 2H; **H^{11}**), 2.2 (m, 4H; **H^{19}**, **H^{20}**), 2.6 (d, 1H, *J* = 12.8; **H^1**), 2.8 (dd, 1H, *J* = 12.8, 4.8 ; **H^1**), 2.9 (m, 4H; **H^7**, **H^{22}**), 3.1 (m, 1H; **H^{17}**), 3.3 (m, 1H; **H^{17}**), 4.2 (m, 1H; **H^6**), 4.4 (m, 1H; **H^2**), 4.5 (m, 1H; **H^{14}**), 5.6 (br, 1H; **H^{16}**), 6.5 (br; **biotin NH**), 7.1-7.5 (m, 25H; **PhH**), 7.8 (d, 1H, *J* = 8; **H^{13}**).

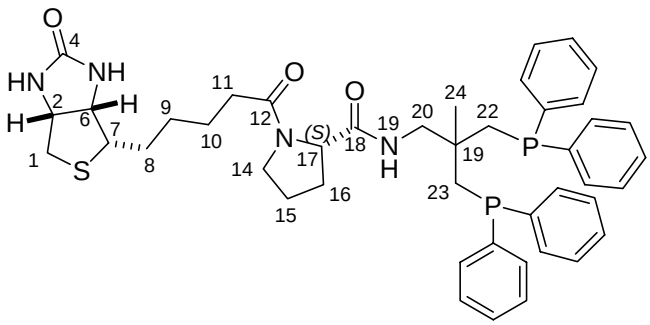
^{13}C NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 25.3 (C10), 26.2 (C21), 28.1 (C8), 28.3 (C9), 31.4 (C18), 35.2 (C11), 38.6 (C22), 39.6 (C19), 39.7 (C20), 40.8 (C1), 49.7 (C17), 55.1 (C14), 56.3 (C7), 60.6 (C2), 62.5 (C6), 128.8-133.6 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 164.7 (C4), 172.8 (C15), 173.7 (C12).

^{31}P NMR (161.98 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = -25.3.

ESI MS for $C_{48}H_{54}N_4O_3P_2S$ (828.3): 829.4.3 (100) $[M+H]^+$.

6.7. Biot-(*S*)-Pro-2

N-*N*-Diisolpropylethylamine (0.14 ml, 0.86 mmol) was added to a solution containing Biot-OC_6F_5 (0.09 g, 0.21 mmol) and the deprotected amino acid diphosphine H-(*S*)-Pro-2 (0.21 mmol) in DMF (8 ml). The mixture was stirred 48 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Hexane/EtOH: 7/3 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam (yield: 0.06g, 0.08mmol, 38%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 0.9 (s, 3H; **H^{24}**), 1.3 (m, 2H; **H^{9}**), 1.6 (m, 4H; **H^{8}**, **H^{15}**), 1.8-2.0 (m, 4H; **H^{22}**, **H^{23}**), 2.1-2.3 (m, 4H; **H^{11}**, **H^{16}**, **H^{10}**), 2.4 (m, 2H; **H^{10}**, **H^{11}**), 2.6 (d, 1H, *J* = 12.8; **H^{1}**), 2.8 (dd, 1H, *J* = 12.8, 4.8 ; **H^{1}**), 3.0 (m, 1H; **H^{7}**), 3.2-3.4 (m, 4H; **H^{14}**, **H^{20}**), 4.1 (m, 1H; **H^{6}**), 4.3 (m, 2H; **H^{17}**), 4.4 (m, 2H; **H^{2}**), 6.0 (br, 2H; **biotin NH**), 6.7 (br, 1H; **H^{19}**), 7.2-7.5 (m, 20H; **PhH**).

^{13}C NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 24.7 (C15), 25.1 (C10), 25.3 (C9), 26.1 (C24), 28.5 (C8), 28.9 (C16), 34.4 (C11), 39.6 (C22), 39.9 (C23), 40.7 (C1), 48.0 (C14), 49.7 (C20), 55.9 (C7), 60.3 (C17), 60.7 (C2), 62.3 (C6), 128.8-132.7 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 164.8 (C4), 172.1 (C18), 173.2 (C12). The quaternary carbon (C21) could not be unambiguously assigned.

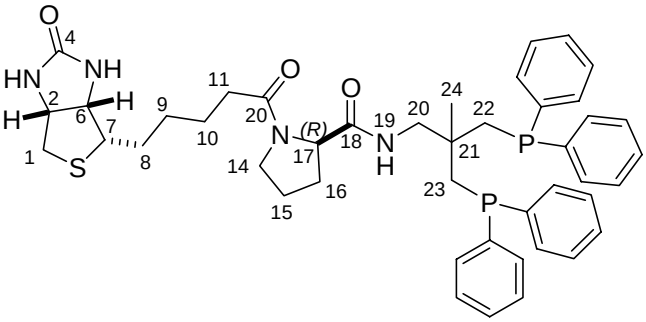
^{31}P NMR (161.98 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = -25.5*, -25.8*, -25.9*.

ESI MS for $C_{44}H_{52}N_4O_3P_2S$ (778.3): 795.3 (5) $[M+H+O]^+$, 779.3 (100) $[M+H]^+$.

* Diastereomeric configurations.

6.8. Biot-(*R*)-Pro-2

N-*N*-Diisolpropylethylamine (0.17 ml, 1.04 mmol) was added to a solution containing Biot-OC_6F_5 (0.11 g, 0.26 mmol) and the deprotected amino acid diphosphine H-(*R*)-Pro-2 (0.26 mmol) in DMF (8 ml). The mixture was stirred 48 h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Hexane/EtOH: 7/3 as eluent, allowing isolation of pure product as a white foam (yield: 0.05g, 0.06mmol, 24%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 0.9 (s, 3H; **H^{24}**), 1.4 (m, 2H; **H^{9}**), 1.6 (m, 4H; **H^{8}**, **H^{15}**), 1.8-2.1 (m, 4H; **H^{22}**, **H^{23}**), 2.2-2.3 (m, 4H; **H^{11}**, **H^{10}**, **H^{16}**), 2.4 (m, 2H; **H^{11}**, **H^{10}**), 2.6 (d, 1H, *J* = 12.8; **H^{1}**), 2.8 (dd, 1H, *J* = 12.8, 4.8 ; **H^{1}**), 3.0 (m, 1H; **H^{7}**), 3.2 (m, 1H; **H^{14}**), 3.4 (m, 3H; **H^{14}**, **H^{20}**), 4.1 (m, 1H; **H^{6}**), 4.2-4.3 (m, 2H; **H^{17}**, **H^{2}**), 5.0 (br, 1H; **biotin NH**), 5.9 (br, 1H; **biotin NH**), 6.9 (br, 1H; **H^{19}**), 7.2-7.5 (m, 20H; **PhH**).

^{13}C NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = 24.7 (C15), 25.1 (C10), 25.3 (C9), 26.1 (C24), 28.5 (C8), 28.9 (C16), 34.4 (C11), 39.6 (C22), 39.9 (C23), 40.7 (C1), 48.0 (C14), 49.7 (C20), 55.9 (C7), 60.3 (C17), 60.7 (C2), 62.3 (C6), 128.8-132.7 (Ph–H), 136.9-138.2 (Ph–C), 164.8 (C4), 172.1 (C18), 173.2 (C12). The quaternary carbon (C21) could not be unambiguously assigned.

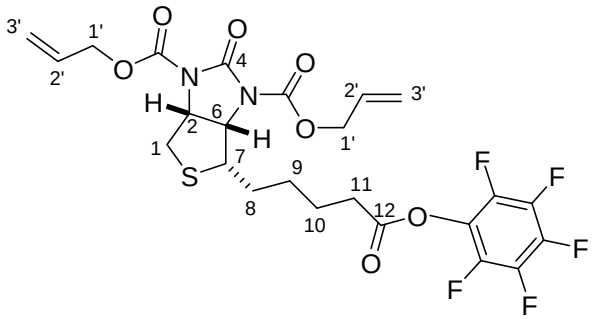
^{31}P NMR (161.98 MHz, $CDCl_3$, 20 °C): δ [ppm] = -25.3*, -25.8*.

ESI MS for $C_{44}H_{52}N_4O_3P_2S$ (778.3): 817.3 (5) $[M+Na+O]^+$, 801.4 (100) $[M+Na]^+$.

* Diastereomeric configurations.

7. [*N*1,*N*3-bis(alloc)]Biotin pentafluorophenyl ester (Biot(Alloc)$_2$OC$_6$F$_5$)

[*N*1,*N*3-bis(alloc)]Biotin[101] (0.4 g, 1.2 mmol) was dissolved in DMF (5 ml). DCC (0.3 g, 1.6 mmol) and pentafluorophenol (0.3 g, 1.6 mmol) were added. The mixture was stirred 3 h at room temperature, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The product was recristallized from MeOH (3 ml), allowing isolation of pure product as a white powder (yield: 0.51g, 0.89mmol, 74%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, d_6-DMSO, 20 °C): δ [ppm] = 1.1-1.9 (m, 6H; **H^8**, **H^9**, **H^{10}**), 2.6 (m, 2H; **H^{11}**), 2.9 (dd, 1H, *J* = 13, 5.5; **H^1**), 3.2 (dd, 1H, *J* = 13, 6.5; **H^1**), 3.4 (m, 1H; **H^7**), 4.6-4.8 (m, 6H; **H^2**, **H^6**, **H$^{1'}$**), 5.2 (dd, 2H, *J* = 10, 1.5; **H$^{3'}$cis**), 5.4 (d, 2H, *J* = 17; **H$^{3'}$trans**), 5.9 (m, 2H; **H$^{2'}$**).

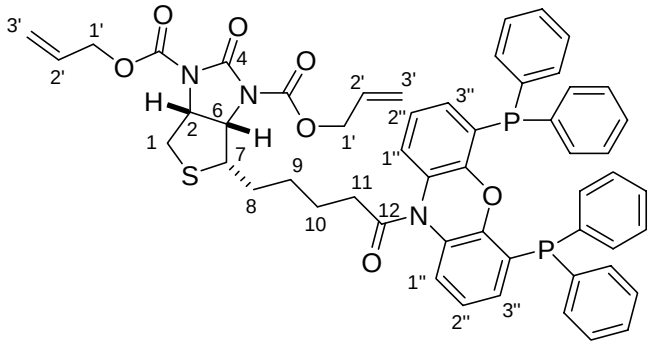
^{13}C NMR (100.62 MHz, d_6-DMSO, 20 °C): δ [ppm] = 24.8 (C10), 27.2 (C9), 27.5 (C8), 33.7 (C11), 36.2 (C1), 52.2 (C7), 58.5 (C6), 60.4 (C2), 67.8 (C1'), 119.5 (C3'), 130.8 (C2'), 148.0 (C4), 151.5 (COOAllyl), 169.1 (C12).

^{19}F NMR (200.00 MHz, DMSO-d_6, 20 °C): δ [ppm] = -153.8, -158.4, -162.2, -162.9, -165.8.

ESI MS for $C_{24}H_{23}F_5N_2O_7S$ (578.1): 578.9 (100) $[M+H]^+$.

8. [*N*1,*N*3-bis(alloc)]Biotin bis(diphenylphosphino)phenoxazine

Sodium hydride (60% in mineral oil 0.01 g, 0.36 mmol) was washed with anhydrous hexane, filtered and added to a solution of 4,6-bis(diphenylphosphino) phenoxazine (0.10 g, 0.18 mmol) in degassed DMF (6 ml). The solution was stirred 2 h at 70°C under nitrogen atmosphere and cooled to ambient temperature. Biot(Alloc)$_2$OC$_6$F$_5$ (0.10 g, 0.18 mmol) was added and the reaction was stirred 48h at rt. The solvent was removed *in vacuo* and the crude precipitate was purified by column chromatography on silica gel 60 F254 using Toluene/EtOH: 50/1 as eluent, allowing isolation of pure product as a yellow powder (yield: 0.08g, 0.08mmol, 47%).



^{1}H NMR (400.13 MHz, CDCl$_3$, 20 °C): δ [ppm] = 1.5-1.7 (m, 6H; **H^8**, **H^9**, **H^{10}**), 2.6 (m, 2H; **H^{11}**), 2.9 (dd, 1H, *J* = 13.2, 4.8; **H^1**), 3.2 (dd, 1H, *J* = 13.2, 5.6; **H^1**), 3.4 (m, 1H; **H^7**), 4.6-4.8 (m, 6H; **H^2**, **H^6**, **H$^{1'}$**), 5.5 (m, 2H; **H$^{3'}$**), 5.9 (m, 2H; **H$^{3'}$**), 6.5 (m, 2H; **H$^{3''}$**), 7.0 (m, 2H; **H$^{2''}$**), 7.2-7.3 (m, 20H; **PhH**), 7.4 (m, 2H; **H$^{1''}$**).

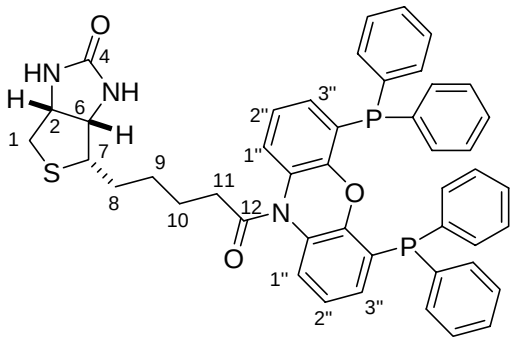
^{13}C NMR (100.62 MHz, CDCl$_3$, 20 °C): δ [ppm] = 25.2 (C10), 26.0 (C9), 28.4 (C8), 34.3 (C11), 36.9 (C1), 52.9 (C7), 59.0 (C6), 60.7 (C2), 68.2 (C1'), 119.9 (C3'), 123.9 (C2''), 125.9 (C1''), 128.7-129.1 (Ph-H), 131.3 (C3''), 131.5 (C2'), 134.4 (Ph–H), 136.6 (Ph–C), 148.6 (C14), 151.7 (COOAllyl), 153.4 (COOAllyl), 172.2 (C12).

^{31}P NMR (161.98 MHz, CDCl$_3$, 20 °C): δ [ppm] = -17.9.

ESI MS for $C_{54}H_{49}N_3O_7P_2S$ (945.3) : 984.3 (15) $[M+Na+O]^+$, 968.3 (100) $[M+Na]^+$.

9. Biotin bis(diphenylphosphino)phenoxazine

A solution of [N1,N3-bis(alloc)]Biotin bis(diphenylphosphino)phenoxazine (0.02 g, 0.02 mmol) in degassed CH_2Cl_2-MeOH (2 : 1) (3 ml) was treated with *N-N'*-dimethylbarbituric acid (3 mg, 0.02 mmol) and tetrakis(palladium) triphenylphosphine (5 mg, 4.2 10^{-3} mmol). The mixture was stirred in absence of light at ambient temperature for 3 h. The solvents were evaporated and the resulting product was suspended in 2 ml of MeOH. Then water (3.5 mL) was added and the mixture was acidified with 2.0 N HCl to pH 2 and kept at 0 °C. The resulting precipitate was filtered and dried under vacuum. However, better methods of purification are still in study in the laboratory (column chromatography on silica gel or HPLC prep).



ESI MS for $C_{46}H_{41}N_3O_3P_2S$ (777.2) : 778.3 (30) $[M+H]^+$, 794.3 (25) $[M+H+O]^+$, 810.3 (100) $[M+H+2O]^+$.

10.Preparation of [Rh(COD)(Biot-spacer)]$^{+}BF_4^{-}$ complexes for catalysis

10.1. General procedure

Each ligand was aliquoted in Pyrex tube (2.02 μmol) and stored in a glove box. For the preparation of the rhodium complex, the metal precursor $[Rh(COD)_2]BF_4$ (4 mg, 10 μmol) was dissolved in degassed DMSO (16 ml) and 2.5 ml of this solution (1.56 μmol) was added to the appropriate aliquoted ligand (2.02 μmol, 1.3 equivalents with respect to the metal precursor). The solution was vortexed at rt for 5 min. This solution could be stored at rt in the glove box and reused for 15 days without any noticeable loss of activity and selectivity.

10.2. Procedure for the screening in the presence of miscible solvents (EtOH, MeOH, Acetone, THF and DMF)

The metal source $[Rh(COD)_2]BF_4$ (5 mg, 12.5 μmol) was dissolved in degassed DMSO (0.5 ml) and 62 μl of this solution (1.56 μmol) was added to the appropriate aliquoted ligand (2.02 μmol, 1.3 equivalents with respect to the metal source). The solution was vortexed at rt for 5 min. Then the desired degassed solvent (2438 μl of EtOH, MeOH, Acetone, THF or DMF) was added.

10.3. Procedure for the screening of non-miscible solvents (EtOAc)

The metal precursor $[Rh(COD)_2]BF_4$ (4 mg, 10 μmol) was dissolved in degassed DMSO (4 ml) and 626 μl of this solution (1.56 μmol) was added to the appropriate aliquoted ligand (2.02 μmol, 1.3 equivalents with respect to the metal precursor). The solution was vortexed at rt for 5 min.

11.Hydrogenation protocol

All organic and aqueous solutions were deoxygenated by flushing nitrogen through the solutions for at least three hours. All operations were performed in a glove box. The following buffers were used: acetate, pH 4.0, 0.1 M final conc.; MOPS: 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid sodium salt pH 7.0, 0.1 M final conc.; phosphate, pH 7.1, 0.07 M final conc.

11.1. Hydrogenation using either acetate or MOPS as buffer

A Pyrex tube (volume ca. 3 mL) was placed in an autoclave and charged with an *N*-acetamidoacrylic acid solution in water (260 µL of a 23.85 mM solution, 6.20 µmol). The buffer solution (100 µL of a 1 M solution) was added and the volume adjusted with water to 900 µl. The protein solution in water was then added (100 µl of a 0.207 mM solution, 0.0207 µmol of the tetramer). The precatalyst solution in DMSO (100 µl, 0.062 µmol) was added last. The resulting mixture was vortexed and hydrogenated at 5 bar.

11.2. Hydrogenation using phosphate buffer

The $[Rh(COD)_2]BF_4$ (4 mg, 10 µmol) was dissolved in DMSO (8 ml) and 1.25 ml of this solution (1.55 µmol) was added to **Biot–1** (2.02 µmol, 1.3 equivalents with respect to the metal source). A Pyrex tube (volume ca. 3 ml) was placed in an autoclave and charged with a phosphate buffer solution (1 ml, 0.07 M) containing *N*-acetamidoacrylic acid (12.4 µmol) and Na_2HPO_4 (12.4 µmol). The protein solution in phosphate buffer was added (1 ml of a 0.041 mM solution, 0.041 µmol of the tetramer). The precatalyst solution in DMSO (100 µl, 0.124 µmol) was added last. The resulting mixture was vortexed and hydrogenated at 5 bar.

11.3. Hydrogenation at different temperatures

An autoclave (volume ca. 10 mL) was charged with an *N*-acetamidoacrylic acid solution in water (1300 µL of a 23.85 mM solution, 6.20 µmol). The buffer solution (500 µL of a 1 M solution) was added and the volume adjusted with water to 4500 µl. The protein solution in water was then added (500 µl of a 0.207 mM solution, 0.0207 µmol of the tetramer). The precatalyst [Rh(COD)(**Biot-1**)]BF_4 solution in DMSO (500 µl, 0.062 µmol) was added last. The resulting mixture was vortexed and hydrogenated at 5 bar. During catalysis the temperatures between 0°C and 40°C were adjusted with a cryostat, and between 50°C and 90°C with a hot plate using oil bath.

11.4. Determination of protein acceleration

An autoclave (volume ca. 30 mL) was charged with an *N*-acetamidoacrylic acid solution in water (3900 µL of a 23.85 mM solution, 6.20 µmol). The buffer solution (1500 µL of a 1 M solution) was added and the volume adjusted with water to 13500 µl. The protein solution in water was then added (1500 µl of a 0.207 mM solution, 0.0207 µmol of the tetramer). The precatalyst [Rh(COD)(**Biot-1**)]BF_4 solution in DMSO (1500 µl, 0.062 µmol) was added last. The resulting mixture was vortexed and hydrogenated at 5 bar. Each 10 min, 1 ml of solution was taken, degassed with nitrogen for 5 min and quenched by adjusting the pH to 2 with 2.0 N aqueous HCl solution.

11.5. Hydrogenation of a mixture of *N*-acetamidoacrylic and *N*-acetamidocinnamic acids

Homogenous system: A Pyrex tube (volume ca. 3 mL) was placed in an autoclave and charged with an *N*-acetamidoacrylic acid solution in buffer (MOPS or MES) 0.38M (130 µl of a 23.85 mM solution, 3.10 µmol), and an *N*-acetamidocinnamic acid solution in buffer (MOPS or MES) 0.38M (130 µl of a 23.85 mM solution, 3.10 µmol). The volume was adjusted with water to 900 µl. The protein solution in water was added (100 µl of a 0.207 mM solution, 0.0207 µmol of the tetramer). The precatalyst solution in DMSO (100 µl, 0.062 µmol) was added last. The resulting mixture was vortexed and hydrogenated at 5 bar.

"Bi-phasic" system: In an autoclave (volume ca. 10 mL) a *N*-acetamidoacrylic acid solution in AcOEt (550 µl of a 56.59 mM solution, 3.10 µmol), and an *N*-acetamidocinnamic acid solution in AcOEt (550 µl of a 56.59 mM solution, 3.10 µmol) were charged. The buffer solution (580 µL of a 0.38 M solution) was added and the volume of the aqueous phase adjusted with water to 975 µl. The protein solution in water was then added (100 µl of a 0.207 mM solution, 0.0207 µmol of the tetramer). The precatalyst solution in DMSO (25 µl, 0.062 µmol) was added last. The resulting mixture was vortexed and hydrogenated at 5 bar.

12.Determination of enantiomeric excess

After stirring the catalysis mixtures for 15 hrs on an orbital shaker at the desired temperature, the reaction was quenched by adjusting the pH to 2 with 2.0 N aqueous HCl solution. The aqueous solution was continuously extracted with ethyl acetate for 3 hrs and the organic phase was evaporated to a minimum volume (0.5 ml). The hydrogenation product was converted in situ to its methyl ester using trimethysulfonium hydroxyde (15 µl) before GC analysis.

IX. Réferences

(1) Blaschke, G.; Kraft, H. P.; Fickentscher, K.; Köhler, F. *Arzneim.-Forsch.* **1979**, *29*.
(2) Stinson, S. C. *Chem. Engineering News* **2001**, *79*, 79-97.
(3) Kagan, H. *l'actualité chimique* **2003**, 10-15.
(4) Blaser, H. U., Spindler, F., Studer, M. *Applied Catalysis A: General* **2001**, *221*, 119-143.
(5) Kragl, U.; Dwars, T. *Trends in Biotechnology* **2002**, *20*, 45-52.
(6) Noyori, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008.
(7) Knowles, W. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1998-2007.
(8) Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2024-2032.
(9) Knowles, W. S., Sabacky, M. J., Vineyard, B. D. *J. Chem. Soc. Chem. Commun* **1972**, 10-11.
(10) Dang, T. P.; B., K. H. *J. Chem. Soc. Chem. Commun* **1971**, 481-482.
(11) Kagan, H. B., Dang, T. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6429-6433.
(12) Knowles, W. S.; Sabacky, M. J.; Vineyard, B. D.; Weinkauff, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 2567-2568.
(13) Miyashita, A.; Yasuda, A.; Takaya, H.; Toriumi, K.; Ito, T.; Souchi, T.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7932-7934.
(14) Noyori, R., Takaya, H. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 345-351.
(15) Noyori, R. *Science* **1990**, *248*, 1194-1199.
(16) Togni, A.; Breutel, C.; Schnyder, A.; Spindler, F.; Landert, H.; Tijanit, A. *J . Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4062-4066.
(17) Blaser, H. U.; Malan, C.; Pugin, B.; Spindler, F.; Steiner, H.; Studer, M. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 103-151.
(18) Spindler, F.; Pugin, B.; Buser, H.; Jalett, H.-P.; Pittelkow, U.; Blaser, H.-U. *Pesticide Science* **1998**, *54*, 302-304.
(19) Burk, M. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 363.
(20) Burk, M. J.; Bienewald, F.; Challenger, S.; Derrick, A.; Ramsden, J. A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3290-3298.
(21) Knowles, W. S. *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 106-112.
(22) Noyori, R.; Kitamura, M.; Ohkuma, T. *PNAS* **2004**, *101*, 5356-5362.
(23) McCulloch, B.; Halpern, J.; Thompson, M. R.; Landis, C. R. *Organometallics* **1990**, *9*, 1392-1395.
(24) Chan, A. C.; Halpern, J. *J . Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 838-840.
(25) Landis, C. R.; Halpern, J. *J . Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1746-1754.
(26) Brown, J. M.; Chaloner, P. A. *J . Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3040-3048.
(27) Jandeleit, B.; Schaefer, D. J.; Powers, T. S.; Turner, H. W.; Weinberg, W. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 2494-2532.
(28) Gennari, C.; Piarulli, U. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3071-3100.
(29) Vogl, E. M., Gröger, H., Shibasaki. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1570-1577.
(30) Smidt, P. S.; Zimmermann, N.; Studer, M.; Pfaltz, A. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4685-4693.
(31) Burckhardt, U., Baumann, M., Togni, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 155-159.

(32) Bugg, T., Ed. *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry* Oxford, 1997.
(33) Ditrich, K., Balkenhohl, F., Ladner, W. *Ger. Offen.* **1997**, DE19534208.
(34) Youshko, M. I.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 3267-3271.
(35) Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G. *Science* **2003**, *299*, 1694-1697.
(36) Powell, K. A.; Ramer, S. W.; Del Cardayre, S. B.; Stemmer, W. P.; Tobin, M. B.; Longchamp, P. F.; Huisman, G. W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 3948-3959.
(37) Reetz, M. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5716.
(38) Fong, S., Machajewski, T. D., Mak, C. C. and Wong, C. H. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 873.
(39) May, O., Nguyen, P. T. and Arnold, F. H. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 317.
(40) Reetz, M. T. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6595-6602.
(41) Reetz, M. T.; Brunner, B.; Schneider, T.; Schulz, F.; Clouthier, C. M.; Kayser, M. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4075–4078.
(42) Reetz, M. T.; Daligault, F.; Brunner, B.; Hinrichs, H.; A., D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4078–4081.
(43) Thomas, C. M.; Ward, T. R. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 337-346.
(44) Qi, D.; Tann, C. M.; Haring, D.; Distefano, M. D. *Chem Rev* **2001**, *101*, 3081-3111.
(45) Kaiser, E. T.; Lawrence, D. S. *Science* **1984**, *226*, 505-511.
(46) Davies, R. R.; Distefano, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11643-11652.
(47) Reetz, M. T. *Chimia* **2002**, *56*, 721-723.
(48) Carey, J. R. M., S. K.; Pfister, T. D.; Garner, D. K.; Kim, H. K.; Abramite, J. A.; Wang, Z.; Guo, Z.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10812-10813.
(49) Wilson, M. E.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306-307.
(50) Lin, C. C.; Lin, C. W.; Chan, A. S. C. *Tetrahedron Asym.* **1999**, *10*, 1887–1893.
(51) Ohashi, M. K., T.; Ueno, T.; Yanase, M.; Fujii, H.; Watanabe, Y. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 1005-1008.
(52) Ueno, T.; Koshiyama, T.; Ohashi, M.; Kondo, K.; Kono, M.; Suzuki, A.; Yamane, T.; Watanabe, Y. *J . Am. Chem. Soc.* **2005**, *xx*, xx.
(53) Ueno, T.; Susuki, M.; Goto, T.; Matsumoto, T.; Nagayama, K.; Watanabe, Y. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 2527-2530.
(54) Bertucci, C.; Botteghi, C.; Giunta, D.; Marchetti, M.; Paganelli, S. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 556-562.
(55) Mahammed, A.; Gross, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2883-2887.
(56) Gyorgy, P.; Rose, C. S.; Hofmann, K.; Melville, D. B.; Du Vigneaud, V. *Science* **1940**, *92*, 609.
(57) Attwood, P. V.; Wallace, J. C. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 113-120.
(58) Wallace, J. C.; Jitrapakdee, S.; Chapman-Smith, A. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **1998**, *30*, 1-5.
(59) Nikolau, B. J.; Ohlrogge, J. B.; Wurtele, E. S. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *414*, 211-222.
(60) Green, N. M. *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 85-133.
(61) Wilbur, D. S.; Pathare, P. M.; Hamlin, D. K.; Stayton, P. S.; To, R.; Klumb, L. A.; Buhler, K. R.; Vessella, R. L. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 113-118.
(62) Hamblett, K. J.; Kegley, B. B.; Hamlin, D. K.; Chyan, M. K.; Hyre, D. E.; Press, O. W.; Wilbur, D. S.; Stayton, P. S. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 588-598.

(63) Nakamura, M.; Tsumoto, K.; Ishimura, K.; Kumagai, I. *Anal. Biochem.* **2002**, *304*.
(64) Lee, B. S.; Gupta, S.; Krishnanchettiar, S.; Lateef, S. S. *Anal. Biochem.* **2005**, *336*, 312-315.
(65) Van Osdol, W. W. S., C.; Dedrick, R. L.; Weinstein, J. N. *J. Nucl. Med.* **1993**, *34*, 1552-1564.
(66) Fukushima, H.; Morgan, H.; Taylor, D. M. *Thin Solid Films.* **1994**, *244*, 789-793.
(67) Green, N. M. *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 51-67.
(68) Wilchek, M.; Bayer, E. A. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 1-4.
(69) DeLange, R. J.; Huang, T. S. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 698-709.
(70) Marttila, A. T.; Laitinen, O. H.; Airenne, K. J.; Kulik, T.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Kulomaa, M. S. *FEBS Lett.* **2000**, *467*, 31-36.
(71) Airenne, K. J.; Marjomaki, V. S.; Kulomaa, M. S. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 87-92.
(72) Livnah, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Sussman, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5076-5080.
(73) Pugliese, L.; Coda, A.; Malcovati, M.; Bolognesi, M. *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 698-710.
(74) Pugliese, L.; Malcovati, M.; Coda, A.; Bolognesi, M. *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 42-46.
(75) Laitinen, O. H.; Airenne, K. J.; Marttila, A. T.; Kulik, T.; Porkka, E.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Kulomaa, M. S. *FEBS Lett.* **1999**, *461*, 52-58.
(76) Chaiet, L.; Wolf, F. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *106*, 1-5.
(77) Bayer, E. A.; Ehrlich-Rogozinski, S.; Wilchek, M. *Electrophoresis.* **1996**, *17*, 1319-1324.
(78) Feltus, A.; Ramanathan, S.; Daunert, S. *Anal. Biochem.* **1997**, *254*, 62-68.
(79) Rosano, C.; Arosio, P.; Bolognesi, M. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 5-12.
(80) Weber, P. C.; Ohlendorf, D. H.; Wendoloski, J. J.; Salemme, F. R. *Science.* **1989**, *243*, 85-88.
(81) Hendrickson, W. A.; Pähler, A.; Smith, J. L.; Satow, Y.; Merritt, E. A.; Phizackerley, R. P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, *86*, 2190-2194.
(82) Laitinen, O. H.; Nordlund, H. R.; Hytonen, V. P.; Uotila, S. T.; Marttila, A. T.; Savolainen, J.; Airenne, K. J.; Livnah, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Kulomaa, M. S. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4010-4014.
(83) Chilkoti, A.; Stayton, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10622-10628.
(84) Freitag, S.; Le Trong, I.; Chilkoti, A.; Klumb, L. A.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 211-221.
(85) Klumb, L. A.; Chu, V.; Stayton, P. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7657-7663.
(86) Hyre, D. E.; Le Trong, I.; Freitag, S.; Stenkamp, R. E.; Stayton, P. S. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 878-585.
(87) Weber, P. C.; Wendoloski, J. J.; Pantoliano, M. W.; Salemme, F. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3197-3200.
(88) Freitag, S.; Le Trong, I.; Klumb, L.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1157-1166.
(89) Freitag, S.; Le Trong, I.; Klumb, L. A.; Chu, V.; Chilkoti, A.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 13-19.
(90) Wilchek, M.; Bayer, E. A. *Methods Enzymol.* **1990**, *184*.
(91) Liu, S. T.; Liu, C. Y. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6079-6080.
(92) Bayer, E. A.; Wilchek, M. *Methods Enzymol.* **1974**, *34*, 265-267.

(93) Wilson, M. E.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2269-2270.
(94) Jones, J. *Amino Acid and Peptide Synthesis*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2002.
(95) Redeuilh, G.; Secco, C.; Baulieu, E. E. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3996-4002.
(96) Garrett, C. E.; Jiang, X.; K., P.; RepiImage, O. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4161-4165.
(97) Okada, Y. *Curr. Org. Chem.* **2001**, *5*, 1-43.
(98) Somlai, C.; Berényi, M.; Maroy, P. Z. *Naturforsch.* **1993**, *48b*, 511-516.
(99) Van der Veen, L. A.; Keeven, P. H.; Schoemaker, G. C.; Reek, J. N. H.; Kamer, P. C. J.; Van Leeuwen, P. W. N. M.; Lutz, M.; Spek, A. L. *Organometallics* **2000**, *19*, 872-883.
(100) Albericio, F. *Biopolymers (Peptide Science)* **2000**, *55*, 123–139.
(101) Allart, B.; Lehtolainen, P.; Yla-Herttuala, S.; Martin, J. F.; Selwood, D. L. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 187 -194.
(102) Beugelmans, R.; Neuville, L.; Bois-Choussy, M.; Chastanet, J.; Zhu, J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3129-3132.
(103) Ramachandran, G. N.; Sasisekharan, V. *Adv. Protein Chem.* **1968**, *23*, 283-438.
(104) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1974**, *13*, 222-245.
(105) Kada, G.; Falk, H.; Gruber, H. J. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1427*, 33-43.
(106) Humbert, N.; Zocchi, A.; Ward, T. R. *Electrophoresis.* **2005**, *26*, 47-52.
(107) Green, N. M. *Methods in Enzymol.* **1970**, *18A*, 418-424.
(108) Collot, J.; Humbert, N.; Skander, M.; Klein, G.; Ward, T. R. *J. Organometallic Chem.* **2004**, *689*, 4868-4871.
(109) Rusbandi, E.; Loosli, A.; Humbert, N.; Gradinaru, J.; Ward, T. R. *in press* **2005**.
(110) MacNeil, P. A.; Roberts, N. K.; Bosnich, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2273-2280.
(111) Landis, C. R.; Halpern, J. *J. Organometallic Chem.* **1983**, *250*, 483-490.
(112) Jacobsen, E. C.; Pfaltz, A.; Yamamoto, H., Eds. *Comprehensive Asymetric Catalysis*; Springer: Berlin, 1999; Vol. 1.
(113) Horsman, G. P.; Liu, A. M. F.; Henke, E.; Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *J. Chem. Eur.* **2003**, *9*, 1933-1939.
(114) Skander, M.; Humbert, N.; Collot, J.; Gradinaru, J.; Klein, G.; Loosli, A.; Sauser, J.; Zocchi, A.; Gilardoni, F.; Ward, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411-14418.
(115) Klein, G.; Humbert, N.; Ward, T. R. *in press* **2005**.
(116) Humbert, N. In *Thèse de doctorat en biologie moléculaire*; Université de Neuchâtel, 2005.
(117) Burk, M. J.; Casy, G.; Johnson, N. B. *J. Org. Chem* **1998**, *63*, 6084-6085.
(118) Ogino, H.; Ishikawa, H. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *109*, 109-116.
(119) Carrea, G.; Riva, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 2226-2254.
(120) Letondor, C.; Humbert, N.; Ward, T. R. *PNAS* **2005**, *102*, 4683-4687.
(121) Vosmann, K.; Schulte, E.; Klein, E.; Weber, N. *Fett/Lipid* **1998**, *100*, 334–342.
(122) Collot, J. In *Thèse de doctorat en chimie*, 2004, pp 117-151.