
Nouvelles Applications des Complexes Métalliques en Catalyse Homogène, avec des Enzymes Artificielles et en Nanotechnologie

Thèse présentée à la faculté des Sciences

Institut de Chimie

Université de Neuchâtel

Par

Julien Pierron

Acceptée sur proposition du jury :

Prof. T. R. Ward, directeur de thèse

Prof. R. Neier, rapporteur

Dr. D. Veghini, rapporteur

Dr. C. Malan, rapporteur

Soutenue le 26 Novembre 2008

Université de Neuchâtel

2008

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Nouvelles applications des complexes
métalliques en catalyse homogène, avec des
enzymes artificielles et en nanotechnologie

Julien PIERRON

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

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

MM. T. Ward (directeur de thèse), R. Neier,
C. Malan (CARBOGEN-AMCIS AG, Hunzenschwil),
et D. Veghini (Sika Technology AG, Zürich)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 8 décembre 2008

Le doyen :
F. Kessler

UNIVERSITE DE NEUCHATEL
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat - décanat de la faculté
Rue Emile-Argand 11 - CP 158
CH-2009 Neuchâtel
Felix Kessler

Sommaire

Sommaire	1
Remerciements	9
Keywords.....	10
Mots clés	10
Abstract	11
Résumé	13
Chapitre I : Introduction	15
1. But de la thèse.....	15
2. Première sphère de coordination : la catalyse homogène.....	16
2.1. <i>Considérations générales.</i>	17
2.2. <i>La catalyse asymétrique et la chiralité.</i>	18
2.3. <i>Réduction énantiosélective des β-cétoesters.</i>	21
2.3.1. L'hydrogénation de β -cétoesters par le binap et ses dérivés.	22
2.3.2. Aspects mécanistiques.....	22
2.3.3. Caractéristiques structurales et origine de la sélectivité.	24
2.4.4. Les ligands biaryles diphosphines représentatifs et leurs évolutions.....	26
3. Deuxième sphère de coordination : catalyse par des métalloenzymes artificielles.	29
3.1. <i>Protéines et catalyse enzymatique.</i>	29
3.1.1. Les différents types de protéines : relation structure-activité.	30
3.1.2. La catalyse enzymatique.....	31

3.2. Les applications de la catalyse enzymatique.....	32
3.2.1. Utilisation de systèmes biologiques non modifiés (classe 1).....	33
3.2.2. Adaptation des systèmes existants par mutagenèse.....	35
3.2.3. Génération de systèmes compatibles.....	36
3.2.3.1. Ancrage covalent : stratégie et exemples.....	36
3.2.3.2. Ancrage non covalent : stratégie et exemples.....	38
3.3. Système biotine-(strept)avidine.	40
3.3.1. Structure tridimensionnelle.....	41
3.3.2. Avidine et streptavidine : homologie et différences.....	42
3.3.3. Ancrage de la biotine : réseau de liaisons hydrogènes.....	43
3.4. L'alkylation allylique asymétrique au palladium.....	44
3.4.1. L'alkylation allylique asymétrique par un complexe (phosphino-oxazoline)palladium. ...	45
3.4.2. Considérations mécanistiques et origines de l'énantiosélectivité de l'alkylation allylique.	46
3.4.3. Les différents systèmes et leurs ligands utilisés en alkylation allylique asymétrique.	48
4. Troisième sphère de coordination : la nanotechnologie.	49
4.1. Considérations générales.	50
4.1.1. Historique.....	50
4.1.2. Les applications industrielles.....	50
4.2. La microscopie.....	51
4.2.1. La microscopie à force atomique (AFM).....	51
4.2.2. La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM : « Scanning Electronic Microscopy »).....	53
4.3. Exemples de systèmes développés en nanotechnologie.....	55
4.3.1. « Metal Organic Frameworks ».....	55
4.3.2. Nanostructure : auto-assemblage d'agrégats d'immunoglobuline GS.....	57

Chapitre II : Première sphère de coordination : Hydrogénation énantiosélective de substrats β-cétoesters précurseurs de la Carnitine.	59
1. Introduction.	59
<i>1.1. Hydrogénation asymétrique des β-cétoesters.</i>	59
<i>1.2. La carnitine.</i>	60
2. Réaction d'hydrogénation catalytique en phase homogène.	62
<i>2.1. Considérations générales.</i>	62
<i>2.2 Les ligands pour l'hydrogénation asymétrique.</i>	64
<i>2.3. Mise en place de la catalyse.</i>	65
<i>2.4. Reproductibilité des résultats.</i>	66
<i>2.5. Evaluation du système catalytique avec différents ligands à 100°C.</i>	67
<i>2.6. Identification du meilleur précurseur métallique.</i>	69
<i>2.7. Identification des différents ligands.</i>	71
3. Résultats du criblage.	73
<i>3.1. Hydrogénation du substrat CAAEt.</i>	73
3.1.1. Etude des complexes donnant la meilleure activité.	73
3.1.2. Etude des complexes donnant la meilleure énantiosélectivité.	75
3.1.3. Evaluation du criblage.	77
3.1.4. Evolution du système catalytique.	77
3.1.4.1. Influence du solvant.	78
3.1.4.2. Influence des additifs.	79
<i>3.2. Expérience sur le substrat l'ester d'éthyle de la carnitine.</i>	81
3.2.1. Méthode pour l'analyse de l'ester d'éthyle de la carnitine.	82

3.2.2. Résultats du criblage.....	83
4. Conclusion.....	84
Chapitre III : Deuxième sphère de coordination : Création de métalloenzymes	
artificielles basées sur la technologie biotine-(strept)avidine pour la réaction d'alkylation	
allylique asymétrique.	
	86
1. Introduction.	86
2. Création des métalloenzymes artificielles pour l'alkylation allylique asymétrique.....	89
2.1. Le système catalytique.	89
2.1.1. Considérations générales.	89
2.1.2. Les types de ligands pour l'alkylation allylique asymétrique.....	90
2.1.2.1. Structures des ligands biotinylés utilisés avec les alkylases hybrides.	90
2.1.2.2. Synthèse du ligand biotinylé de type terpyridine (Biot-terpy).....	91
2.1.2.3. Evaluation des différents ligands dans l'alkylation allylique asymétrique.	93
2.1.3. Influence des agents de transfert de phase sur la catalyse.	94
2.1.5. Mise en œuvre de la catalyse.	97
2.2 Evolution chimio-génétique du système des métalloenzymes artificielles.	98
2.2.1. Diversité chimique.....	99
2.2.2. Diversité génétique.	101
2.2.3. Large criblage de l'alkylase hybride via la diversité chimio-génétique.	102
2.2.4. Sélection de résultats testés avec le précurseur métallique $[PdCl(\eta^3-Ph_2allyl)]_2$	105
2.3. Evaluation de l'état de la protéine après la catalyse.	107
2.3.1 Evaluation de tous les paramètres de la catalyse sur la nature du précipité.....	107
2.3.2. Evaluation de la conformation de la protéine par électrophorèse sur SDS-PAGE.	109
2.3.3 Evaluation de la conformation de la protéine par dichroïsme circulaire.	112
2.3.4. Influence de la base sur la catalyse.	115

3. Conclusions et perspectives.	117
Chapitre IV : Troisième sphère de coordination : Synthèse de ligands biotinylés pour la création de structures 1D et 2D par auto-assemblage hiérarchique de streptavidine.....	119
1. Introduction.	119
2. Résultats et Discussion.	121
2.1. Concepts et généralités.	121
2.2. Synthèse des différents ligands.	124
2.2.1. Première stratégie : synthèse d'un ligand tris-biotinylé.....	124
2.2.2. Deuxième stratégie : synthèse d'un complexe métallique tétra-biotinylé.	125
2.2.3. Deuxième stratégie : synthèse d'un ligand organique tétra-biotinylé.....	128
2.3 Formation et caractérisation du polymère de protéine en microscopie à force atomique (AFM).	131
2.3.1. Mise en place des conditions de polymérisation de protéine.....	132
2.3.1.1. Préparations des solutions de protéine en présence des ligands 2 et 6.	132
2.3.1.2. Préparations des plaques d'analyse pour la microscopie.	132
2.3.2. Résultats des expériences réalisées en AFM.	134
2.3.2.1. Adsorption de la streptavidine sur une plaque de silicium.	134
2.3.2.2. Expérience du « scratch ».....	136
2.3.2.3. Adsorption d'un polymère de streptavidine en présence du ligand 2.	138
2.3.2.4. Adsorption d'un polymère de streptavidine en présence du ligand 6.	140
2.3.2.5. Conclusions des expériences AFM.	142
2.3.3. Formation et caractérisation du polymère de protéine en microscopie électronique à balayage (MEB).....	143
3. Conclusion.	145

Chapitre V :	Conclusion générale et perspectives.	146
Chapitre VI :	Matériel et Méthodes.	149
1.	Abréviations et Glossaire.	149
2.	Appareillages.	151
2.1.	<i>Dichroïsme circulaire : CD.</i>	151
2.2.	<i>Résonance magnétique nucléaire : RMN (NMR).</i>	151
2.3.	<i>Chromatographie liquide : HPLC.</i>	151
2.4.	<i>Chromatographie gazeuse : GC.</i>	152
2.5.	<i>Spectrométrie de masse : MS.</i>	152
3.	Experimental procedure for the nanotechnology project.	153
3.1.	<i>Experimental procedure for the synthesis of 2.</i>	153
3.1.1.	tris(3,6,9,12-tetraoxaheptadecyl alcohol)-1,3,5- benzenetricarboxylate: 1.	153
3.1.2.	tris((biotin)-3,6,9,12-tetraoxaheptadecyl)benzene-1,3,5-tricarboxylate: 2.	154
3.2.	<i>Experimental procedure for the synthesis of 6.</i>	155
3.2.1.	<i>N</i> -Biotinyl-3,6-dioxaoctane-1,8-diamine: 3.	155
3.2.2.	<i>N,N'</i> -Bis(8-biotinamido-3,6-dioxaoctanyl-1,8-diamino)-5-(<i>N</i> -tert-butylloxycarbonyl)aminoisophthalamide: 4.	156
3.2.3.	<i>N</i> -(3,6-dioxaoctanyl-1,8-diamino) isonicotinamide: 5.	157
3.2.4.	Synthesis of Biot ₂ -Py: 6.	159
3.3.	<i>Experimental procedure for the synthesis of 12.</i>	160
3.3.1.	3-(biotinamido) butanoic acid: 7.	160
3.3.2.	3-(biotinamido) butanoate pentafluorophenyl ester: 8.	161
3.3.3.	1- <i>N'</i> -(8-amino-3,6-dioxaoctanyl)-3-(biotinamido) butanamide: 9.	162
3.3.4.	1- <i>N'</i> -(8-amino-3,6-dioxaoctanyl)-3-(biotinamido) butanamide: 10.	163

3.3.5. Synthesis of tetra biotinylated ligand: 12.	164
3.4. <i>Polystyrene spin coating on silicon or glass plates.</i>	165
4. Experimental procedure for the Asymmetric Allylic Alkylation.....	166
4.1. <i>Protein expression and purification.</i>	166
4.2. <i>Protein expression and purification.</i>	166
4.3. <i>Experimental Procedure for the chemogenetic screening of artificial allylic alkylases.</i>	166
4.4. <i>Protocol for the Asymmetric Allylic Alkylation for the isolation and characterization of the products.</i>	167
4.5. <i>Experimental procedure for the synthesis of biotinylated ligand Biot-terpy.</i>	168
4.5.1. <i>4'-O-ethanolamine-2,2':6',2''-terpyridine.</i>	168
4.5.2. <i>Biot-terpy.</i>	169
4.6. <i>Analytical Data.</i>	170
5. Experimental procedure for the Asymmetric Hydrogenation.....	170
5.1. <i>General procedure for hydrogenation.</i>	170
5.2. <i>Analytical Method.</i>	171
6. Annex.....	172
6.1. <i>NMR spectrum of 2.</i>	172
6.2. <i>NMR spectrum of 6.</i>	173
6.3. <i>NMR spectrum of 12.</i>	174
6.4. <i>NMR spectrum of Biot-terpy.</i>	175
7. Appendices.	176

<i>7.1. Tableau de catalyse pour l'hydrogénation des β-cétoesters.</i>	<i>176</i>
<i>7.2. Tableau de catalyse pour l'alkylation allylique asymétrique.</i>	<i>181</i>
8. Références bibliographiques.	194

Remerciements

Je tiens à remercier le professeur Thomas Ward pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant ces quatre années et pour m'avoir donné la chance de travailler sur des projets intéressants. Je le remercie également pour la confiance, le soutien ainsi que pour l'ensemble des connaissances qu'il m'a apportées durant cette période.

Je remercie sincèrement les membres du jury d'avoir accepté de lire et de juger ce travail. A ce titre, je remercie le professeur Reinhard Neier, le docteur Dario Veghini, le docteur Christophe Malan et le professeur Thomas Ward.

J'adresse mes meilleurs sentiments à tous les étudiants et apprentis avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer au cours de ces années.

Je remercie chaleureusement les membres du laboratoire et les collaborateurs de l'institut pour leurs précieux conseils, ainsi que pour les moments amicaux passés en leur compagnie. Je tiens tout particulièrement à remercier Anca Pordea avec qui j'ai passé deux années formidables dans le même laboratoire, Christophe Letondor et Marc Creus pour toutes ces discussions scientifiques enflammées, pour leurs aides et leurs conseils ainsi que Christophe Malan qui a largement contribué à ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes amis de Neuchâtel qui m'ont toujours soutenu dans les moments difficiles à travers toutes ces agréables soirées passées ensemble. Je ne citerai personne en particulier, j'aurais trop peur d'en oublier. Je leurs dirai simplement : merci !

Enfin, j'aimerais témoigner toute ma gratitude à mes parents, mon frère et Audrey sa compagne, ainsi que mon grand-père pour leur soutien inconditionnel pendant toute cette période et parce-que sans eux tout cela n'aurait pas été possible.

Keywords

Enantioselective hydrogenation ♦ β -ketoester ♦ carnitin ♦ Homogeneous catalysis ♦
Artificials metalloenzymes ♦ Asymmetric allylic alkylation ♦ protein ♦ Chemo-genetic
optimization ♦ polymer ♦ Electronic microcopy ♦ Atomic force microscopy ♦
Nanotechnology.

Mots clés

Hydrogénation énantiosélective ♦ β -cétoester ♦ carnitine ♦ catalyse homogène ♦
Métalloenzymes artificielles ♦ Alkylation allylique asymétrique ♦ Protéine ♦ Optimisation
chimio-génétique ♦ Polymère ♦ Microscopie électronique ♦ Microscopie à force atomique ♦
Nanotechnologie.

Abstract

Metal chemistry has a large number of applications, thanks to the optimization potential of metallic complexes. The properties of these complexes can be varied as a function of the metallic centre and the coordinated ligands, which can be varied to afford the required characteristics. In recent years, metal complexes have gained importance in different fields of chemistry, such as organic synthesis, catalysis, pharmaceuticals or materials.

In this study, we focused on some new applications of metal complexes in two blooming areas : asymmetric catalysis and materials.

In enantioselective catalysis, the subtle details that govern chiral discrimination are difficult to predict. Improving the performances of such catalysts often relies on trial-and-error procedures. Homogenous catalysts are optimized chemically, while the biocatalysts are developed using genetic modifications.

We tested the potential of chemical optimization for the asymmetric hydrogenation of a β -ketoester. This project, realized in collaboration with Lonza AG, allowed the identification of active and selective Ru-diphosphine complexes, for the reduction under mild conditions of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate, a key intermediate in the synthesis of carnitine. Screening a library of diphosphine ligands in combinaison with several metal precursors and in presence of different solvents and / or additives, allowed the identification of a highly selective catalyst for the asymmetric ketone reduction. The $[\text{RuCl}_2\{(S)\text{-Cy-soniphos}}]$ complex afforded the ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate with up 95% ee.

In a second approach, the supramolecular anchoring of a biotinylated organometallic catalyst into a host protein ((strept)avidin) affords versatile artificial metalloenzymes, which offer a new dimension for catalyst optimization. For such hybrid catalysts, the metallic part is responsible of the activity, while the interaction with the host protein determines the

selectivity. Combining chemical and genetic modification allows the optimization of the system. This technique was implemented for the asymmetric allylic alkylation, a new reaction in the field of enzymatic catalysis. A chemogenetic optimization allowed the identification of highly selective hybrid catalysts for the asymmetric allylic alkylation of 1,3-diphenyl-2-propenyl acetate using dimethyl malonate as a nucleophile. The artificial metalloenzyme $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+ \subset \text{S112A}$ afforded the dimethyl 2-(1,3-diphenylallyl)malonate with up to 90% ee (*R*).

Nanotechnology is a new domain of application of metal complexes. The creation and the characterization of polymers containing a protein and a metallic moiety open the way to developing new biocompatible materials. In this spirit, the synthesis of different biotinylated ligands allowed the preparation of streptavidin polymers using different polymerization conditions, as well as the use of different microscope techniques for the visualization of the polymer (AFM, SEM).

Résumé

La chimie des métaux a trouvé un grand nombre d'applications, grâce à l'immense potentiel d'optimisation des complexes métalliques. Les propriétés de ces complexes varient en fonction du centre métallique et des ligands coordonnés, qui peuvent être diversifiés afin d'obtenir les caractéristiques désirées. Dans les dernières années, l'importance des complexes métalliques s'est accrue dans diverses directions comme la synthèse organique, la catalyse, les médicaments ou les matériaux.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à quelques nouvelles applications des complexes métalliques dans deux domaines en plein essor : la catalyse asymétrique et les matériaux.

Lors de la catalyse énantiosélective, les mécanismes de discrimination sont issus d'interactions subtiles et difficiles à prévoir. L'amélioration des performances des catalyseurs asymétriques résultent donc le plus souvent d'une succession d'essais. Les catalyseurs homogènes sont optimisés chimiquement, tandis que les biocatalyseurs sont développés suite à des modifications génétiques.

Nous avons exploité une optimisation chimique pour l'hydrogénation catalytique énantiosélective d'un β -cétoester. Ce projet, réalisé en collaboration avec l'entreprise Lonza AG, a permis l'identification des complexes Ru-diphosphines actifs et sélectifs pour la réduction dans des conditions douces du 4-chloro-3-oxobutanoate d'éthyle, un intermédiaire clé dans la synthèse de la carnitine. Un criblage a été effectué en présence d'une librairie de ligands diphosphines combinés avec plusieurs précurseurs métalliques et différents solvants et / ou additifs. Ces expériences nous ont permis l'identification d'un catalyseur hautement sélectif pour l'hydrogénation asymétrique. Le complexe $[\text{RuCl}_2\{(\text{S})\text{-Cy-soniphos}\}]$ produit le 4-chloro-3-hydroxybutanoate d'éthyle avec 95% ee.

Dans une deuxième approche, la création de métalloenzymes artificielles par incorporation supramoléculaire d'un complexe métallique biotinylé dans la streptavidine offre une nouvelle dimension pour l'optimisation des catalyseurs. Ainsi, la partie métallique est responsable de l'activité, alors que les interactions avec la protéine hôte déterminent la sélectivité. Des modifications chimiques et génétiques permettent l'optimisation du système. Nous avons implémenté un tel système pour l'alkylation allylique asymétrique, une réaction absente du répertoire de la catalyse enzymatique. Une optimisation chimio-génétique nous a permis d'identifier un catalyseur hybride hautement sélectif pour l'alkylation allylique asymétrique de l'acétate de 1,3-diphényl-2-propényle en utilisant le malonate de diméthyle comme nucléophile. L'enzyme artificielle $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+ \subset \text{S112A}$ produit le malonate de diméthyl 2-(1,3-diphénylallyle) avec 90% ee en faveur de l'énantiomère (*R*).

La nanotechnologie est un nouveau domaine d'exploration pour les applications des complexes métalliques. La création et la caractérisation de polymères contenant des protéines et une partie métallique ouvrent la voie au développement de nouveaux matériaux biocompatibles. Dans cet esprit, la synthèse de différents ligands biotinylés a permis la réalisation de polymères de streptavidine dans des différentes conditions de polymérisation, ainsi que l'évaluation de différentes techniques de microscopie pour la visualisation de ces polymères (AFM, MEB).

Chapitre I : Introduction

1. But de la thèse.

Trois différents sujets ont été abordés dans le cadre de cette thèse. Ces trois sujets ont en commun l'influence de l'environnement sur un métal (ou centre métallique).

Le premier sujet traite de la première sphère de coordination du métal sur la catalyse moléculaire asymétrique. L'exemple pris pour cette étude est l'hydrogénation asymétrique de β -cétoester. Cette réaction connaît un attrait grandissant, d'une part grâce à l'importance des alcools chiraux couramment utilisés pour la synthèse de produits à haute valeur ajoutée, et d'autre part par l'évolution importante de la synthèse de nouveaux ligands.

Le deuxième sujet traite de l'influence de la seconde sphère de coordination sur la catalyse supramoléculaire asymétrique. L'exemple pris pour cette étude est l'alkylation allylique asymétrique par les métalloenzymes artificielles. La partie organométallique assure l'activité catalytique, ce qui permet de définir le type de transformation. Par une seconde sphère de coordination bien définie, la protéine assure la sélectivité et son optimisation génétique aléatoire ou rationalisée peut fournir une librairie de métalloenzymes possédant un environnement unique. Cette diversité est idéale pour un criblage à haut débit de ces catalyseurs.

Dans la continuité des recherches développées au laboratoire et afin d'étendre les applications des métalloenzymes artificielles, une nouvelle génération d'enzymes artificielles a été développée pour l'alkylation allylique asymétrique. La mise au point d'un tel système

est d'autant plus intéressante qu'aucune enzyme naturelle connue à ce jour ne catalyse cette réaction.

Le troisième sujet concerne la « troisième sphère de coordination ». L'exemple sélectionné est l'étude des systèmes macroscopiques basés sur la création de polymères de streptavidine. L'ampleur des recherches réalisées sur des assemblages de molécules ou de macromolécules biologiques est de plus en plus importante. Les nombreuses applications dans des différents domaines, comme les nouveaux matériaux, le stockage de gaz ou l'électronique, montrent que l'association d'un complexe métallique avec un ligand et une protéine pour créer des polymères coordonnés s'inscrit directement dans l'évolution des nouvelles applications à l'interface de la chimie, la microtechnique et la biologie moléculaire.

Dans l'introduction, il est nécessaire de définir les différentes notions qui sont rattachées aux trois différents sujets. La discussion est composée de trois chapitres qui concernent les résultats obtenus dans le cadre de ces trois projets. Le premier chapitre concerne le test de nouveaux complexes dans l'hydrogénation asymétrique de substrats β -cétoester. Le deuxième chapitre s'intéresse à la création d'un nouveau système de métalloenzymes artificielles pour la réaction d'alkylation allylique asymétrique. Enfin, le troisième chapitre se rapporte à la création de structures multi-dimensionnelles par auto-assemblage de la streptavidine.

2. Première sphère de coordination : la catalyse homogène.

Par définition, un catalyseur est dit homogène lorsqu'il ne forme qu'une seule phase avec les réactifs. Par extension, le terme « catalyse homogène » sous-entend que le catalyseur est soluble dans le milieu réactionnel, le plus souvent en phase liquide. Le catalyseur est

consommé lors d'une première étape de réaction, puis il est restitué sous sa forme initiale. Il n'apparaît donc pas dans le bilan de réaction globale. De plus, il permet d'accélérer une transformation chimique et il est introduit en quantité inférieure à la stœchiométrie.

2.1. Considérations générales.

Si un catalyseur ne change pas la thermodynamique d'une réaction chimique (faisabilité d'une transformation), il en modifie la cinétique.^[1,2] Les niveaux énergétiques des réactifs et des produits sont les mêmes ($\Delta G = \text{constante}$), mais l'énergie d'activation est abaissée par la présence du catalyseur ($\Delta G_{\text{non catalysé}}^{\ddagger} \gg \Delta G_{\text{catalysé}}^{\ddagger}$).

Du point de vue du mécanisme, il existe plusieurs catégories de catalyseurs homogènes. Les catalyses les plus représentatives sont :^[2]

- acides ou basiques (on la qualifie de catalyse homogène acido-basique) ; ce type de catalyse est rencontrée en synthèse organique pour des réactions comme l'acétalisation des dérivés carbonylés ou encore l'hydrolyse d'esters.
- oxydants ou réducteurs (on la qualifie de catalyse homogène oxydo-réductrice) ; généralement, ce type de catalyse implique l'utilisation des complexes organométalliques et est rencontrée en synthèse organique pour des réactions comme l'hydrogénation des β -cétoesters.

A partir des années 1940, l'utilisation des métaux en chimie donne naissance à un nouveau type de catalyse, la catalyse organométallique, qui est devenue une discipline à part entière de la chimie.^[2-4] Dans les années 1960, la découverte du complexe de Wilkinson^[5] conduit à l'hydrogénation des oléfines (figure I 2.1 a)). Puis dans les années 1970, un autre type de réactions catalysées au palladium émerge sous l'impulsion de deux pionniers : Heck

et Tsuji qui ont tous deux laissé leur nom à des réactions catalysées par ce métal. En effet, ces deux réactions sont maintenant largement employées en synthèse organique (figure I 2 1 b) et c)). Depuis, la catalyse organométallique est en plein essor.

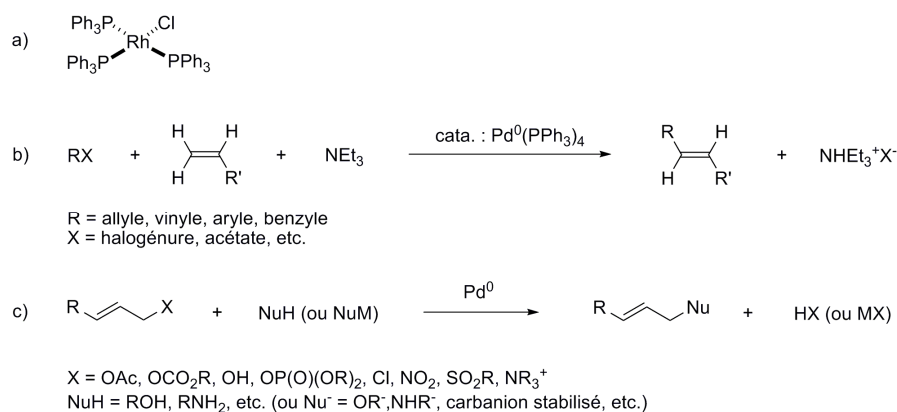


Figure I 2.1 a) Complexe de Wilkinson-Osborn. b) Réaction de Heck. c) Réaction de Tsuji-Trost.

2.2. La catalyse asymétrique et la chiralité.

La chiralité est la propriété que possède un objet de ne pas être superposable à son image dans un miroir. Si une molécule est chirale, elle possède deux formes énantiomères, une lévogyre et une dextrogyre. Le mélange équimolaire de deux énantiomères constitue un mélange racémique.

De multiples exemples sont maintenant connus où une activité biologique donnée est essentiellement liée à un seul des deux énantiomères. L'affaire de la thalidomide qui provoqua dans les années 1970 en Allemagne de nombreuses malformations chez les nouveau-nés a eu des répercussions profondes sur l'industrie pharmaceutique. Celle-ci mettant l'accent sur la prudence nécessaire à la commercialisation d'un médicament racémique. La législation distingue actuellement très clairement un énantiomère de son mélange racémique. La F.D.A. (Food and Drug Administration) n'impose pas l'usage

systematique d'un énantiomère, mais exige une étude biologique poussée des deux énantiomères du mélange racémique.^[6] Par ailleurs, les brevets de certains produits vendus en mélange racémique ne sont pas reconduits et sont transformés pour une commercialisation du principe actif sous forme d'un seul énantiomère (« racemic switch »).^[7] En 2005, sur les dix médicaments les plus vendus dans le monde, neuf sont chiraux. Pour les quatre premiers d'entre eux, un seul des deux énantiomères est actif.^[8] Il est donc indispensable de disposer de techniques appropriées pour obtenir ces molécules ainsi que leurs intermédiaires chiraux (synthons). La synthèse de ces composés sous forme énantiomériquement pure est souvent difficile.^[1]

Il existe différentes techniques pour produire un seul des deux énantiomères :^[3,9]

- l'enrichissement optique d'un mélange racémique, par exemple par co-cristallisation d'un seul énantiomère, peut être efficace, mais implique un rendement maximum de 50%.
- le développement d'une hémisynthèse à partir de substances naturelles contenant les centres asymétriques recherchés est une autre solution. Ce procédé suppose de disposer d'une quantité suffisante de substance naturelle appropriée (acides aminés, carbohydrates, alcaloïdes, etc...).
- la synthèse énantiosélective.

Parmi ces méthodes, la catalyse énantiosélective apparaît très attrayante, en vue de créer de nouvelles applications des complexes métalliques pour l'hydrogénation asymétrique de β -cétoesters. En 1971, Kagan^[10] rapporte la synthèse du ligand chiral (*R,R*)-diop (figure I 2.2), qui permet le développement de la catalyse asymétrique dans la continuité des travaux publiés peu de temps avant par Noyori^[11] et Knowles.^[12] Ce type de synthèse énantiosélective apparaît très prometteuse car la réactivité et la sélectivité peuvent, en théorie, être contrôlées

par un choix judicieux du complexe organométallique (métal-ligand chiral) dont les propriétés stéréoelectroniques sont modulables.^[1]

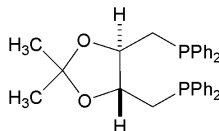


Figure I 2.2. (*R,R*)-diop, ligand chiral diphosphine alkyle.

Dès lors, la recherche et le développement dans le domaine de la catalyse énantiosélective permettent à de nombreuses applications de voir le jour. La (*S*)-DOPA (figure I 2.3), un médicament utilisé contre la maladie de Parkinson, a été produite à grande échelle par Monsanto grâce à la synthèse asymétrique mise au point de Knowles^[13]. Au début des années 80, Sharpless développe la catalyse asymétrique d'époxidation des alcools allyliques, une réaction très utile en chimie organique.^[14-16] Ces travaux sur l'oxydation lui vaudront le prix Nobel en 2001 conjointement à Knowles^[17] et Noyori^[18] pour leurs travaux en hydrogénation asymétrique.

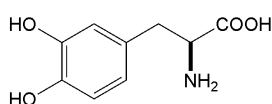


Figure I 2.3. (*S*)-DOPA (anti-Parkinson) issue de la première application industrielle recourant à la catalyse énantiosélective.

2.3. Réduction énantiosélective des β -cétoesters.

Un grand nombre de composés chiraux avec une activité biologique significative est synthétisé à partir d'alcools fonctionnalisés optiquement actifs. Pour obtenir ces alcools chiraux, indispensables à la synthèse de produit à haute valeur ajoutée (pharmacologie, agrochimie, parfumerie, nouveaux matériaux), la réduction asymétrique de cétones est une méthode de choix.^[1,4] Quelques exemples de composés chiraux synthétisés *via* une réduction énantiosélective de cétone sont présentés dans la figure I 2.4.

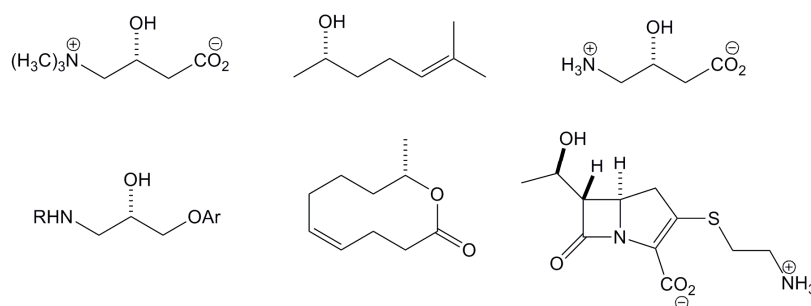


Figure I 2.4. Composés chiraux synthétisés à partir de réduction de cétones par hydrogénation asymétrique.

Très étudiée ces quatre dernières décennies, l'hydrogénation énantiosélective est pour une grande part liée à l'évolution qu'a connue la catalyse asymétrique.^[9]

Bien qu'il existe de nombreux systèmes décrits dans la littérature, ce sont sans conteste les travaux de Noyori et la découverte du binap et de ses dérivés qui a marqué un tournant pour l'hydrogénation asymétrique de cétones.^[1,4,18]

2.3.1. L'hydrogénation de β -cétoesters par le binap et ses dérivés.

Les catalyseurs de type $[\text{RuL}_2\text{-binap}]$ sont très actifs et hautement sélectifs pour des cétones possédant un groupe fonctionnel ou un hétéroatome voisin (β -cétoester, α -hydroxycétone, etc.) capable d'interagir sur le centre métallique.^[19]

Par exemple, le 4-chloro-3-hydroxyester chiral (figure I 2.5), précurseur de la Carnitine et du GABOB, est obtenu quantitativement et très sélectivement en 4 minutes.^[1]

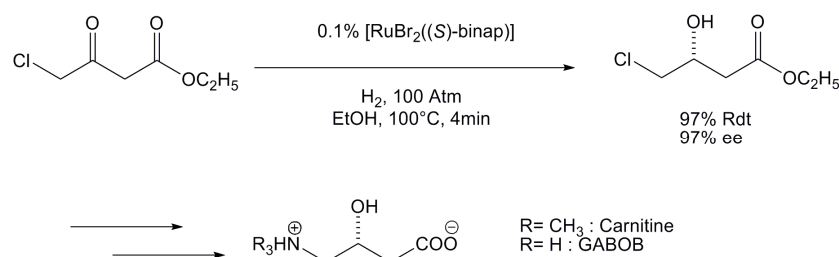


Figure I 2.5. Exemple de réduction du 4-chloro-3-hydroxyester en Carnitine ou en GABOB.

2.3.2. Aspects mécanistiques.

Le cycle catalytique pour l'hydrogénation asymétrique d'un β -cétoester est illustré dans la figure I 2.6.^[1] Le précurseur catalytique a une structure de polymère qui se dissocie en monomère dans des solvants protiques de types alcools. Après exposition à l'hydrogène, une molécule de HCl est éliminée pour donner le complexe (A). Ce complexe forme de façon réversible le complexe β -cétoester (B) par insertion du substrat et libération des molécules de solvant. Le transfert d'hydrogène de ce complexe (du Ru à la cétone coordonnée) est l'étape clé de l'énantiodiscrimination du substrat. Ce transfert amène à la formation du complexe (C). La libération de l'hydroxyester et la formation du complexe (D) est facilitée par le solvant

alcoolique. La réaction de **(D)** avec de l'hydrogène complète le cycle catalytique et régénère le complexe de départ **(A)**.

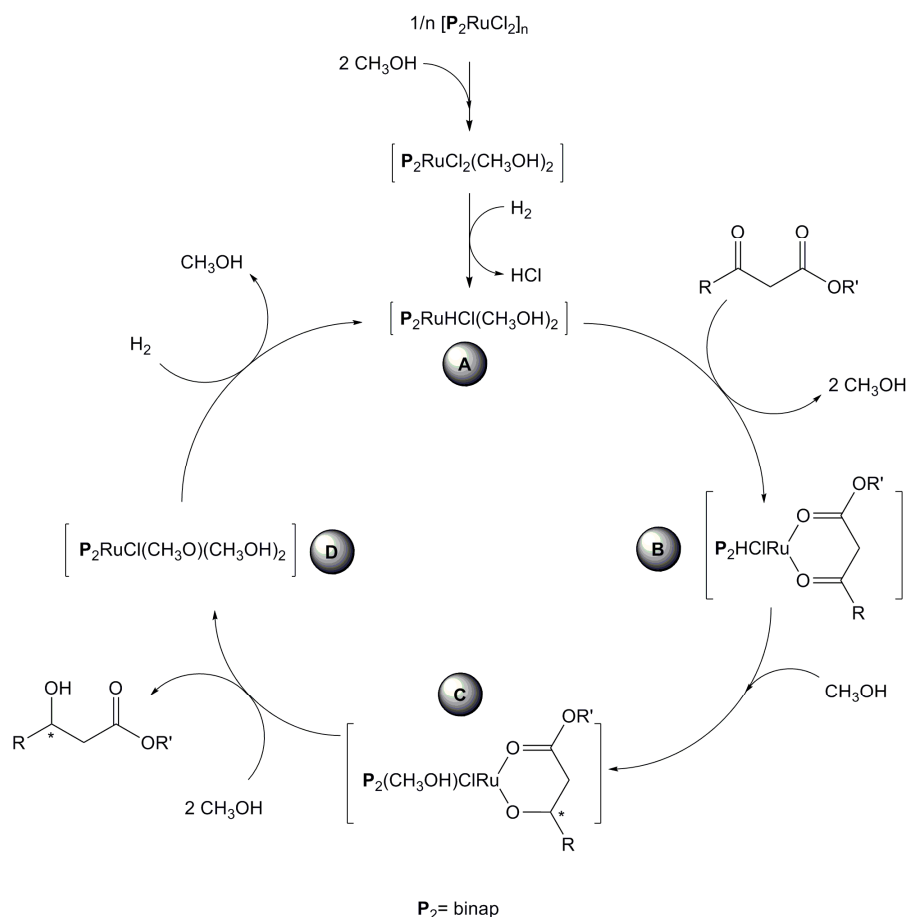


Figure I 2.6. Cycle catalytique proposé pour l'hydrogénation asymétrique d'un β -cétoester par le système Ru-binap.

Le complexe (*R*)-binap-Ru associé au β -cétoester comme ligand bidentate σ -donneur forme deux complexes diastéréomériques. Du fait de la disposition stéréochimique des atomes d'hydrogène, les diastéréomères doivent être transformés de façon stéréospécifique en produit hydroxyester. L'hydrure est transféré *via* un état de transition concerté à 4 centres. La géométrie de l'état de transition et sa stabilité est dictée par la chiralité du ligand (figure I 2.7).

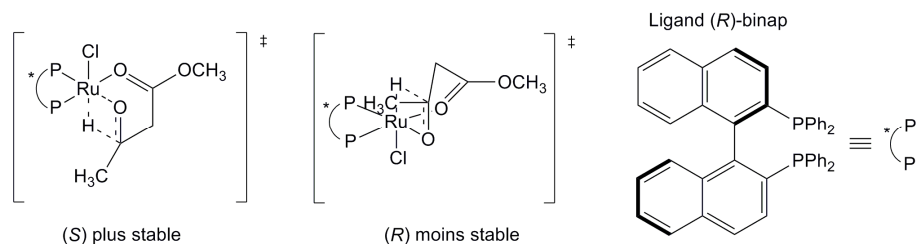


Figure I 2.7. Etats de transition et interaction phényle-alkyle du complexe (*R*)-binap-Ru (les groupements phényle du ligand ne sont pas représentés afin de simplifier la figure).

L'énantiomère (*S*) de l'alcool généré est plus stable que la forme (*R*) qui doit faire face à des répulsions non-covalentes entre le groupement phényle du complexe et alkyle du substrat.^[1]

L'étude du système (*R*)-binap-Ru et ses performances en hydrogénation asymétrique ont ouvert la voie au développement de nouveaux ligands.

2.3.3. Caractéristiques structurales et origine de la sélectivité.

Un ligand diphosphine dérivé d'un squelette biaryle (figure I 2.8) forme des complexes avec différents atomes métalliques, un phénomène attribuable à sa principale caractéristique : la flexibilité de son axe biaryle C(1)-C(1') et la possibilité de contrôler les propriétés électroniques des résidus biarylphosphines annexes. Pour un même ligand associé à différents métaux, les structures aux rayons X montrent des angles diédraux différents. Par exemple, l'angle diédral du complexe $[\text{Rh}(\text{C}_7\text{H}_8((R)\text{-binap})]\text{ClO}_4$ est de 74.4° ^[20] alors qu'il est de 65.6° pour le complexe $\text{Ru}(\text{OCO-}i\text{Bu})_2((R)\text{-binap})$.^[21]

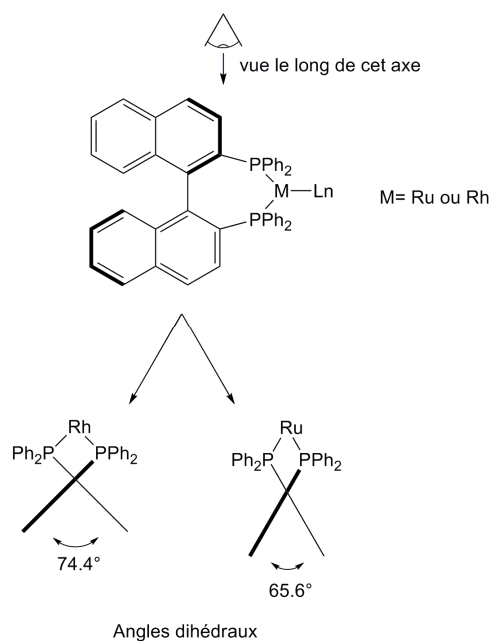


Figure I 2.8. Représentation schématique des angles diédraux d'un complexe de rhodium et d'un complexe de ruthénium (les deux complexes sont présentés sous leurs formes (*R*)).

L'énantiosélectivité de l'hydrogénation asymétrique catalysée par des complexes métalliques avec des ligands biaryles peut être souvent expliquée sur les bases de la règle des quadrants.^[22] Quand on observe le ligand binap de manière à avoir l'axe métal-phosphore et les groupements phényles équatoriaux dans un même plan, alors ces deux groupements phényles équatoriaux occupent l'espace de deux quadrants opposés. De ce fait, un substrat s'approche d'un centre métallique de manière à minimiser les interactions stériques avec les groupements phényles équatoriaux. La figure I 2.9 illustre l'état favorable et l'état défavorable de l'état de transition dans la réaction d'hydrogénation asymétrique du méthyl acétoacétate catalysée par un complexe de Ru-binap. L'état de transition 2 (ET-2) est pénalisé par la répulsion stérique entre le groupe méthyle du substrat et les groupes phényles équatoriaux. Pour l'état de transition 1 (ET-1), les répulsions stériques sont minimales ce qui permet l'obtention de l'énantiomère (*R*) comme produit majoritaire.^[18]

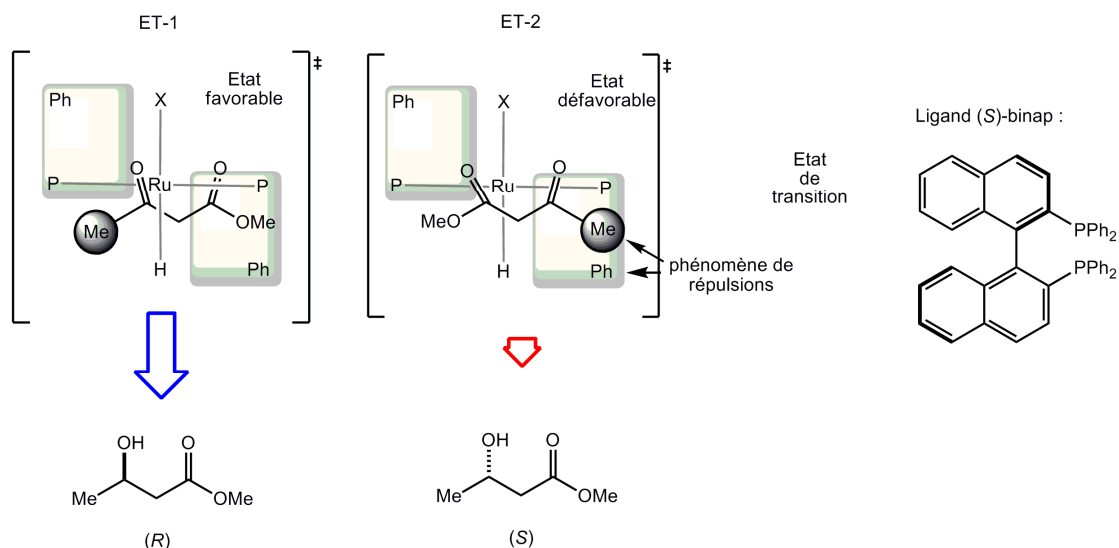


Figure I 2.9. Réaction d'hydrogénation asymétrique catalysée par le ruthénium du méthyl acetoacétate : relations stéréochimiques de l'état de transition basées sur la règle des quadrants.

2.4.4. Les ligands biaryles diphosphines représentatifs et leurs évolutions.

De nombreux ligands de type biaryles à chiralité axiale ont été développés à partir de la fin des années 80. Plus de 50 modifications du motif biaryle ont été reportées jusqu'à ce jour.^[23]

De nouveaux ligands sont généralement développés dans un souci d'augmenter l'énantiosélectivité et l'activité catalytique, de faciliter la synthèse et enfin de contourner les brevets sur des ligands déjà existants. Si la plupart des nouveaux ligands sont développés pour l'hydrogénation asymétrique, certains sont également performants dans d'autres réactions comme l'alkylation allylique ou l'oxydation.

La voie la plus intéressante pour améliorer l'efficacité de ces ligands consiste à varier les substituants portés par l'atome de phosphore en position 2 et 2'.^[24-26] Cela permet de moduler les propriétés stériques et électroniques du ligand. La figure I 2.10 montre les modifications qui ont été apporté au binap et à la plupart des ligands de cette classe.

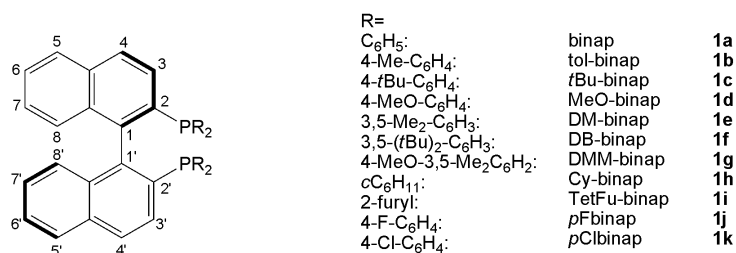


Figure I 2.10. Différentes modifications apportées au ligand binap en position 2 et 2'.

D'autres modifications ont également été apportées sur le squelette binaphthyle.^[27] Dans la plupart des cas, ces fonctionnalisations ont été réalisées pour étendre l'utilisation du ligand binap. L'introduction hydrophobes ou hydrophiles^[27-29] de substituants sur le squelette binaphthyle peut avoir un impact considérable sur l'énantiosélectivité. La figure I 2.11 illustre quelques une de ces substitutions.

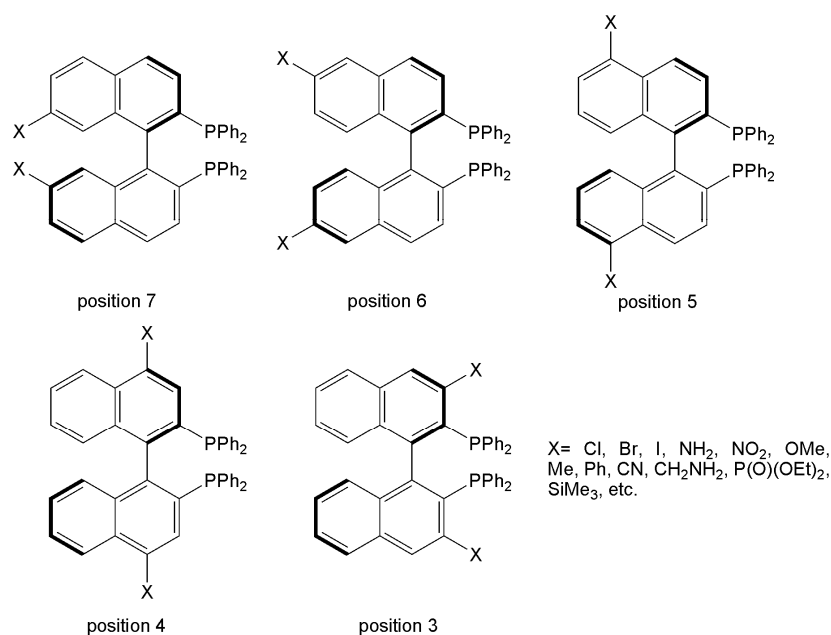


Figure I 2.11. Représentation des ligands de type binap avec une substitution sur le squelette binaphthyle.

Le développement de ligands avec un squelette biphenyle a commencé dans les années 90. Les ligands de type biphenyle présentent deux avantages. L'angle diédral peut être

facilement modifié en contrôlant la taille des substituant en position 6 et 6' du squelette biphenyle. Egalement, la basicité des atomes de phosphore peut être ajusté par l'introduction de substituant avec des propriétés électroniques différentes sur le squelette biaryle (figure I 2.12).

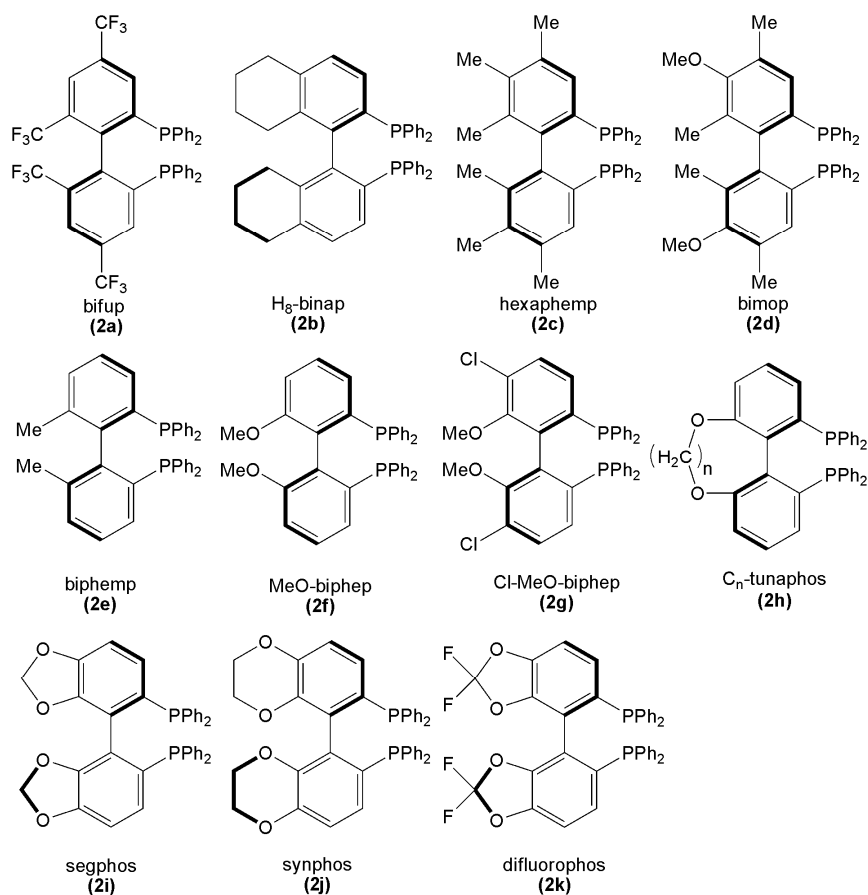


Figure I 2.12. Représentation des ligands de type biphenyle les plus communs (seul le ligand (R) a été représenté).

Après la découverte du biphemp (**2e**)^[30] une variété de ligands biphenyles ayant des groupes alkyles en positions 6 et 6' du squelette biphenyle tel que le H₈-binap (**2b**)^[31] et l'hexaphemp (**2c**) ont été rapportés.^[32] Le bimop (**2d**)^[33] et le bifup (**2a**)^[34] ont été synthétisés très tôt pour modifier les effets électroniques par substitution sur le squelette biaryle. La synthèse du ligand MeO-biphemp (**2f**),^[35] portant des groupements méthoxy en position 6 et 6'

du squelette biphényle, a été amélioré grâce à une réaction d'ortho-lithiation. Ce protocole a été beaucoup utilisé dans le développement de nouveaux ligands avec un atome d'oxygène en position 6 et 6' comme le ligand Cl-MeO-biphep (**2g**).^[36]

Le concept de contrôle de l'angle diédral a été introduit avec le ligand tunaphos (**2h**)^[37] et segphos (**2i**).^[38] Le ligand synphos (**2j**)^[39,40] est souvent pris comme un analogue du ligand segphos, bien qu'initialement il a été développé comme analogue du ligand H₈-binap. Le ligand difluorophos (**2k**) possède une déficience électronique, tout en gardant le même angle diédral que le ligand segphos.^[41,42]

Tous ces ligands sont utilisés dans le cadre de synthèse de molécules actives dans des domaines comme la médecine, l'agriculture ou l'agro-alimentaire. On peut citer comme exemple la réduction de l'éthyl 4-chloro-3-oxobutanoate en 4-chloro-3-hydroxyester précurseur de la carnitine et du GABOB.

3. Deuxième sphère de coordination : catalyse par des métalloenzymes artificielles.

Dans cette partie, il est nécessaire de définir le concept de métalloenzymes artificielles et d'introduire la réaction d'alkylation allylique asymétrique.

3.1. Protéines et catalyse enzymatique.

Les protéines sont des macromolécules composées d'une succession d'acides aminés. Elles se retrouvent dans le monde vivant avec des fonctions très diverses comme le transport

de molécules (l'hémoglobine), la catalyse (les enzymes) ou encore la reconnaissance moléculaire (le système immunitaire).

3.1.1. Les différents types de protéines : relation structure-activité.

La fonction des protéines est due en grande partie à leur structure tri-dimensionnelle, c'est-à-dire à la manière dont les acides aminés sont agencés les uns par rapport aux autres dans l'espace. C'est la raison pour laquelle les méthodes de détermination des structures tri-dimensionnelles, ainsi que les mesures de la dynamique des protéines, sont importantes et constituent un champ de recherche très actif. En plus de ces méthodes expérimentales, de nombreuses études portent sur la prédiction structurale des séquences protéiniques par des techniques informatiques.

La structure est le support de l'activité. Ce concept général est encore plus significatif en ce qui concerne les protéines. Ainsi, la fonction d'une protéine est liée à sa structure, qui peut-être complexe et spécifique.

Quelques exemples de la relation structure-activité sont :^[43,44]

- Certaines protéines transmembranaires impliquées dans le transport de molécules à travers la membrane cellulaire présentent un arrangement structural où les acides aminés hydrophobes sont en contact avec la bicouche lipidique, alors que les acides aminés polaires se voient spatialement arrangés permettant le passage des molécules polaires.

- La forme des cellules et des tissus ainsi que leur résistance aux contraintes physiques sont déterminées par les protéines structurales, comme le collagène. En effet, le collagène est une glycoprotéine fibreuse (association de 3 hélices) dont le rôle peut-être comparé à une armature inextensible.

- Les enzymes, qui catalysent les transformations chimiques du vivant, sont un autre exemple marquant. Au même titre que les anticorps, les enzymes possèdent un site spécifique pour fixer le ou les substrats qu'elles transforment. Compte tenu du rôle primordial qu'elles jouent dans le métabolisme, leur structure est très étudiée.

3.1.2. La catalyse enzymatique.

Une enzyme est une protéine qui possède une activité catalytique. La structure bien définie d'une enzyme est à la fois un avantage et un inconvénient pour les chimistes.

Une enzyme peut catalyser une transformation de manière hautement régiosélective et énantiosélective. Elle a la capacité de distinguer deux mêmes fonctions qui seraient indifférenciables en chimie organométallique. Ces biocatalyseurs ne requièrent pas la protection de certaines fonctions chimiques comme c'est le cas en catalyse homogène. Dans le cas des métalloenzymes l'arrangement de la protéine autour du métal est structuré et fournit une seconde sphère de coordination bien définie.^[45] Toutefois cette grande sélectivité s'accompagne souvent d'une faible tolérance en termes de variation de substrats. Afin de mieux comprendre les avantages de la catalyse enzymatique, elle est comparée à la catalyse homogène dans le tableau I 3.1.^[46,47]

Tableau I 3.1. Comparatif entre la catalyse homogène et la catalyse enzymatique.

	Catalyse homogène	Catalyse enzymatique
Variation de substrats	Elevée	Faible
Accès aux énantiomères	2 énantiomères	1 seul énantiomère
Tolérance aux solvants et additifs	Elevée	Faible
Tolérance des fonctions et régiosélectivité	Faible	Elevée
Efficacité (TON et TOF)	Modeste	Elevée
Optimisation	Chimique	Génétique
Répertoire de réactions	Elevé	Faible
Seconde sphère de coordination	Mal définie	Bien définie

Tenant compte ces considérations, la catalyse homogène et la catalyse enzymatique apparaissent complémentaires sur bien des aspects.^[48,49]

3.2. Les applications de la catalyse enzymatique.

L'évolution de l'ingénierie biomoléculaire au cours de ces vingt dernières années a permis de développer des synthèses efficaces, basées sur l'utilisation de catalyseurs enzymatiques.^[46,50] Actuellement, on compte plus d'une centaine de procédés industriels faisant intervenir des biocatalyseurs et la recherche académique, qui est en plein essor dans ce domaine, stimule encore ce développement.^[51]

Les biocatalyseurs peuvent être divisés en trois classes : les systèmes existants non modifiés, les systèmes adaptés aux contraintes et les systèmes artificiels ou générés. La

première classe fait intervenir des systèmes biologiques dont les propriétés ne sont pas modifiées. La deuxième classe comprend les biocatalyseurs qui sont adaptés par mutagenèse afin de les rendre utilisables ou plus performants en synthèse. La dernière classe regroupe les systèmes « artificiels » dont les propriétés sont créées pour répondre aux besoins de la synthèse (réactions, substrats, conditions).

3.2.1. Utilisation de systèmes biologiques non modifiés (classe 1).

La pénicilline acylase (« penicillin amidohydrolase ») est utilisée industriellement pour l'élaboration d'antibiotiques tels que l'Amoxicilline et le Cefaclor. C'est une synthèse partielle réalisée à partir de la pénicilline-G. L'enzyme hydrolyse d'abord le groupement acyle présent, puis réintroduit d'autres groupements acyles produisant ainsi plusieurs dérivés. Ce procédé rapporte à l'industrie pharmaceutique plus d'un milliard de dollars par an (figure I 3.1).^[50]

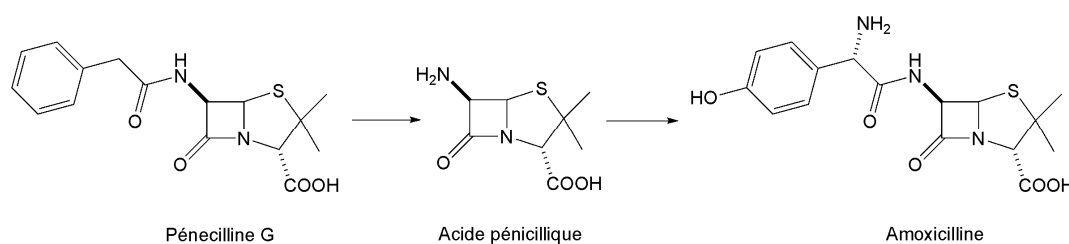


Figure I 3.1. Réactions catalysées par la pénicilline acylase.

D'autres classes d'enzymes comme les nitrilases, les lipases ou les déshydrogénases sont couramment utilisées dans l'industrie ou dans les laboratoires. Les nitrilases catalysent l'hydrolyse de la fonction cyano (groupement CN) en acide.^[52] Les lipases sont surtout employées en résolution cinétique pour l'hydrolyse ou la formation d'esters.^[53,54] Les

déshydrogénases sont utilisées pour l'oxydoréduction des alcools et des cétones.^[46] Ces dernières fonctionnent le plus souvent à l'aide d'un cofacteur d'oxydation, tel que le NAD(P)H ou le FADH, qu'il est nécessaire de régénérer. La régénération peut être réalisée de différentes manières. Par exemple, une deuxième enzyme comme la formiate déshydrogénase peut être utilisée pour réduire le cofacteur (figure I 3.2).^[55,56]

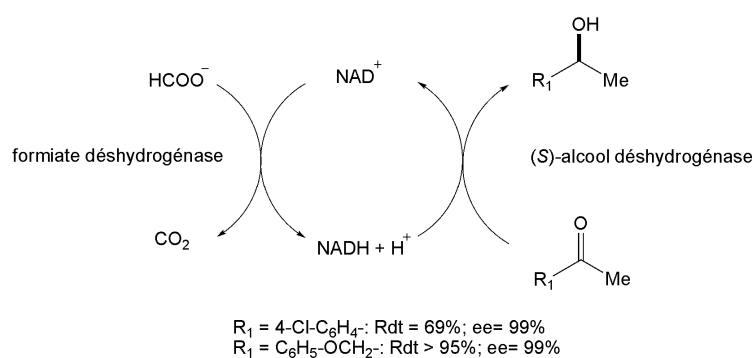


Figure I 3.2. Réduction énantiosélective de cétones par des biocatalyseurs.

D'autres systèmes biologiques sont capables de se passer de cofacteur d'oxydoréduction. K. Faber et al.^[57] emploient les cellules lyophilisées de *Rhodococcus ruber* qui consomment un substrat sacrificiel (2-propanol ou acétone) pour réduire ou oxyder le substrat.

Bien que ces exemples soient concluants, la plupart du temps il est nécessaire d'adapter ces systèmes biologiques aux exigences des chimistes. La faible tolérance des enzymes pour d'autres substrats que ceux qui leurs sont propres est une limitation évidente. De plus, il est parfois souhaitable d'obtenir l'énantiomère (*R*) alors que l'enzyme est naturellement (*S*)-sélective ou l'inverse. D'un point de vue pratique, il est parfois nécessaire d'adapter ces procédés à des températures plus élevées ou aux solvants organiques.^[51]

3.2.2. Adaptation des systèmes existants par mutagenèse.

Des réponses aux problèmes de l'adaptation des systèmes enzymatiques sont apportées par la biologie moléculaire et les techniques de mutations génétiques.

La PCR (« Polymérase Chain Reaction ») et l'évolution dirigée permettent de générer rapidement une immense librairie d'enzymes mutées.^[50] Ces mutants possèdent un certain nombre de propriétés qui peuvent différencier de la protéine de type sauvage (WT = « Wild type ») et sont autant de candidats potentiellement plus efficaces que la protéine WT pour la réaction visée.^[50] Cependant, une telle librairie n'est réellement efficace que si elle est associée à une technique de criblage à haut débit afin de sélectionner rapidement les meilleurs candidats.^[58]

Un exemple d'adaptation d'une lipase, utilisée pour la résolution cinétique d'esters, est présenté ci-dessous (figure I 3.3). Par une recombinaison epPCR et mutagenèse par saturation, Reetz et al.^[59] ont obtenu un mutant qui augmente le facteur d'énantiosélectivité (E) de 1.1 à 25.8.

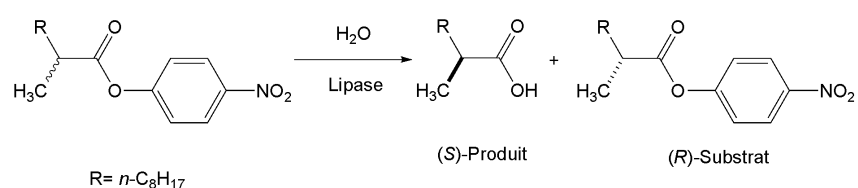


Figure I 3.3. Résolution cinétique du 2-méthyldecanoate de *p*-nitrophényle.

Le facteur de sélectivité E se définit comme le rapport des vitesses d'une même réaction réalisée avec chacun des énantiomères, (*R*) et (*S*) : $E = V_R / V_S$.

Ces techniques de mutagenèse se révèlent très efficaces pour optimiser les biocatalyseurs.^[60] Cependant elles ne permettent pas de modifier le type de transformation

catalysée par l'enzyme.^[61] Bien que ce domaine soit en pleine expansion, les catalyseurs biologiques offrent, à ce jour, un choix de transformations plus restreint en comparaison aux réactions accessibles par la catalyse homogène.^[46] De ce fait, les biocatalyseurs ne répondent pas totalement aux besoins des chimistes pour la synthèse asymétrique.^[46,50,61]

3.2.3. Génération de systèmes compatibles.

La création de métalloenzymes artificielles est une approche efficace pour créer un catalyseur compatible avec différents types de transformations. Cette méthode consiste à introduire un complexe organométallique, qui assure l'activité catalytique, dans une protéine qui apporte la sélectivité par son environnement chiral structuré.

3.2.3.1. Ancrage covalent : stratégie et exemples.

E. T. Kaiser et al.^[62] a été le premier à modifier chimiquement le site actif d'une enzyme pour accrocher de manière covalente un analogue de coenzyme. Cette méthode implique que l'enzyme native possède un acide aminé susceptible de former une liaison covalente avec la molécule que l'on veut insérer dans la protéine. Cet acide aminé, généralement nucléophile (le plus souvent lysine ou cystéine) doit être suffisamment accessible pour réagir. L'enzyme artificielle peut avoir une activité catalytique totalement différente de l'enzyme native. En accrochant un dérivé de flavine (cofacteur d'oxydoréduction) à la papaïne (enzyme du type hydrolase), qui possède une cystéine accessible dans le site actif, E. T. Kaiser crée une oxydoréductase artificielle. Depuis, cette stratégie d'ancrage covalent à partir d'acides aminés nucléophiles est largement utilisée pour

la création d'enzymes semi-synthétiques. Ces points d'ancrage peuvent désormais être facilement introduits grâce aux techniques de mutagenèse.^[63]

Plusieurs groupes de recherche utilisent l'ancrage covalent des catalyseurs dans des protéines hôtes, comme métalloenzymes artificielles pour la catalyse énantiosélective afin de créer des biocatalyseurs asymétriques.^[64-67] Par exemple, la combinaison de la papaine avec un complexe rhodium-phosphite permet l'hydrogénation catalytique de l'ester 2-acétamidoacrylate de méthyle (figure I 3.4).^[68]

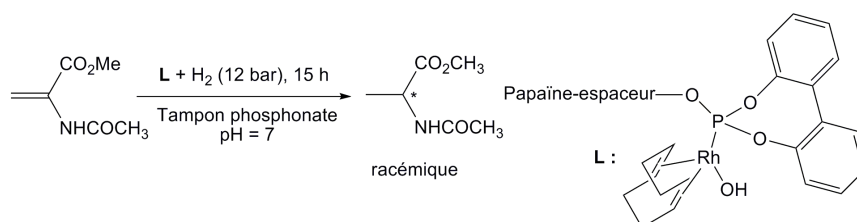


Figure I 3.4. Biocatalyseur artificiel pour l'hydrogénation énantiosélective d'oléfines.

Ce catalyseur hybride réduit l'oléfine quantitativement mais se révèle malheureusement non sélectif.

Si l'ancrage covalent semble permettre l'incorporation de n'importe quel motif non naturel, compatible avec la taille de la cavité de la protéine, il présente néanmoins certains inconvénients. La modification chimique de macromolécules n'est pas triviale car une protéine peut posséder plusieurs sites « d'ancrage », rendant difficile le contrôle de la réactivité du motif à insérer.^[69] De plus, il est indispensable de contrôler le taux d'accrochage et le cas échéant de pouvoir purifier l'enzyme artificielle désirée.^[65,68]

3.2.3.2. Ancrage non covalent : stratégie et exemples.

A la différence de l'ancrage covalent, cette technique n'impose pas la modification chimique de la protéine hôte. L'ancrage supramoléculaire du complexe organométallique dans la protéine est basé sur des interactions non covalentes de type électrostatique, hydrophobe ou liaison hydrogène.

Y. Watanabe et al.^[70] utilisent des complexes de type base de Schiff (salophène de Fe, Mn ou Cr) qui se fixent de manière non covalente dans l'apomyoglobine. La nouvelle enzyme formée oxyde sélectivement le thioanisole jusqu'à 32% ee en faveur de l'énantiomère (S).^[71]

Z. Gross et al.^[72] utilisent la BSA ou HSA (Bovine ou Human Serum Albumin) comme protéine hôte pour fixer des complexes de corolles amphiphiles afin de former des catalyseurs énantiosélectifs en sulfoxydation (figure I 3.6).

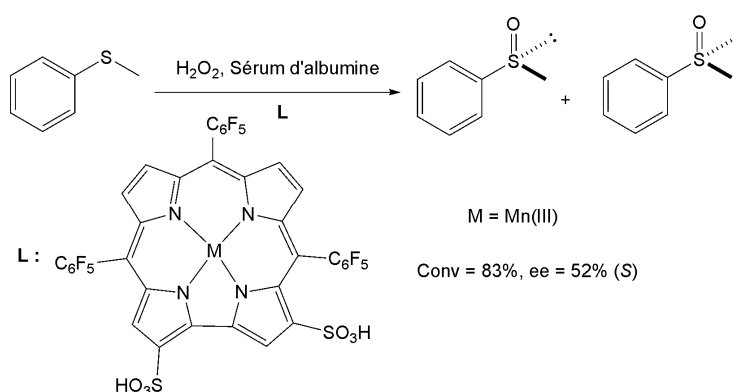


Figure I 3.6. Sulfoxydation asymétrique par des catalyseurs hybrides utilisant l'albumine.

Whitesides et Wilson^[73] proposent, en 1978, l'utilisation du système biotine-avidine pour la création de métalloenzymes artificielles. En accrochant un complexe de rhodium à la biotine (substrat naturel de l'avidine), le dérivé organométallique se fixe de manière quasiment irréversible dans la protéine hôte (l'avidine). Par cette méthode, l'acide α -

acétamidoacrylique peut être hydrogéné avec 41% ee. En 1999, Chan et al.^[74] développent un nouveau complexe de rhodium biotinylé, en utilisant un ligand diphosphine chiral énantio pur, qui en présence d'avidine réduit l'acide itaconique avec 48% ee.

Plus récemment encore, notre groupe a décrit l'utilisation de la streptavidine, ainsi que de l'avidine, avec de nombreux complexes de rhodium pour l'hydrogénation énantiosélective d'oléfines fonctionnalisées ou bien des complexes de ruthénium pour la réduction de cétone par transfert hydrogénéant. Pour le deuxième exemple cité, une optimisation chimique et génétique du système biotine-(strept)avidine a permis d'obtenir d'excellents résultats avec une sélectivité atteignant 97% d'excès énantiomérique en faveur de l'énantiomère (*R*) (figure I 3.7).^[49,75-81]

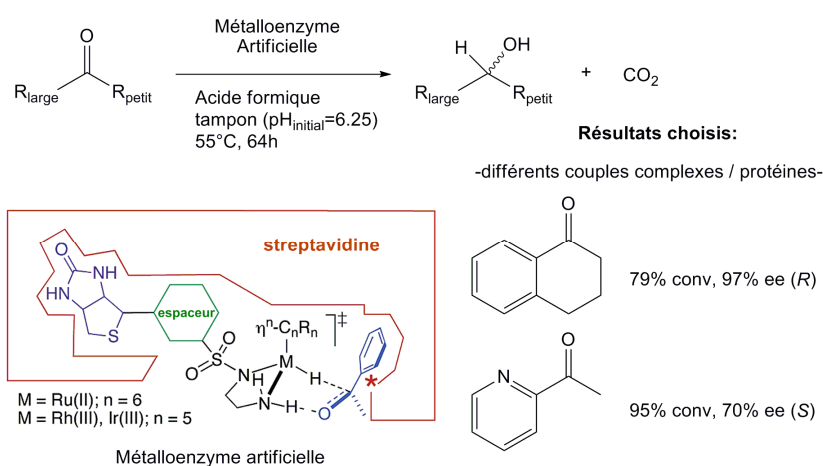


Figure I 3.7. Représentation schématique du catalyseur hybride obtenu par un ancrage supramoléculaire basé sur le système biotine-(strept)avidine.

En considérant l'ensemble des différents systèmes, la technologie biotine-(strept)avidine apparaît très intéressante. L'ancrage non covalent ne requiert pas la modification chimique de la protéine hôte. Cette stratégie s'avère donc plus rapide, moins contraignante et également mieux adaptée pour une approche combinatoire de criblage à haut débit.

3.3. Système biotine-(strept)avidine.

L'avidine et la streptavidine sont deux protéines généralement étudiées en parallèle car elles présentent de nombreuses similitudes, malgré une origine différente. L'avidine est présente naturellement dans le blanc d'œuf des oiseaux, des amphibiens et des reptiles,^[82] alors que la streptavidine est produite par la bactérie *Streptomyces avidinii*.^[83] Leur masse est d'environ 65 kDa pour l'avidine (128 acides aminés par sous unité) et environ 62.5 kDa pour la streptavidine (130 acides aminés par sous unité).^[82,84] Leur point commun essentiel est une très grande affinité pour leur substrat, la biotine (vitamine H) (figure I 3.8).^[85] Il s'agit de l'interaction non covalente naturelle la plus forte connue à ce jour.^[82,86] Cette caractéristique confère à ces deux protéines une activité supposée d'antibiotique, comme inhibiteur des enzymes biotine-dépendantes.^[84] Bien que très similaire, l'affinité de la streptavidine ($K_a \sim 2.5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$) est inférieure à celle de l'avidine ($K_a \sim 1.5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$).^[87,88] Cette valeur reste cependant largement supérieure à celles observées pour d'autres systèmes. Par exemple, pour un couple anticorps-antigène la moyenne est de $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}$, pour un couple inhibiteur-enzyme la valeur est de $\sim 10^{4-6} \text{ M}^{-1}$ et pour un complexe organique classique, invité-hôte, la moyenne est de $\sim 10^{2-4} \text{ M}^{-1}$.^[87,89]

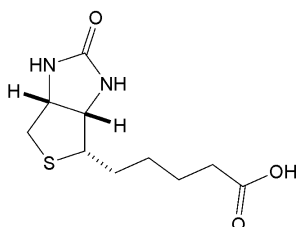


Figure I 3.8. Structure de la (+)-biotine ou vitamine H.

Ces deux protéines sont très robustes. L'avidine résiste à la dénaturation thermique jusqu'à 85°C (132°C en présence de biotine). Elles résistent également à la dénaturation dans une gamme de pH allant de 2 à 13.^[82]

En plus de caractéristiques physico-chimiques similaires, elles présentent une structure tertiaire et quaternaire comparable.^[86]

3.3.1. Structure tridimensionnelle.

Ces deux protéines sont homotétramériques, organisées en dimère de dimère. Chaque monomère, ou sous unité, est constitué de 8 feuillets β antiparallèles organisés en tonneau β . Le tonneau β présente une torsion hélicoïdale chirale et forme une cavité hydrophobe capable de fixer la biotine de manière quasiment irréversible.^[86,90,91] La structure schématique de la streptavidine est présentée dans la figure I 3.9.

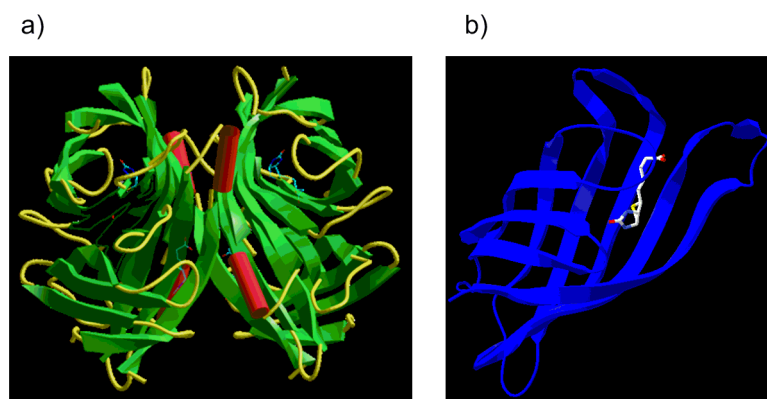


Figure I 3.9. a) Tétramère de streptavidine, b) Détail d'un des monomères contenant la biotine.

La cohésion de cette structure est assurée par des interactions diverses, de type polaires (liaisons hydrogènes), hydrophobes ou Van der Waals.^[83,86] Bien que l'avidine et la

streptavidine présentent cette même architecture, leur séquence primaire compte quelques différences notables.

3.3.2. Avidine et streptavidine : homologie et différences.

Seuls 30% de la séquence primaire de l'avidine et de la streptavidine sont identiques (homologie à 41%). On peut tout de même remarquer six zones dans la séquence qui cumulent un taux d'identité élevé de 64% (homologie à 74%).^[83,86,87] Ces zones correspondent aux feuillets β qui forment le tonneau β (figure I 3.10).^[86,87]

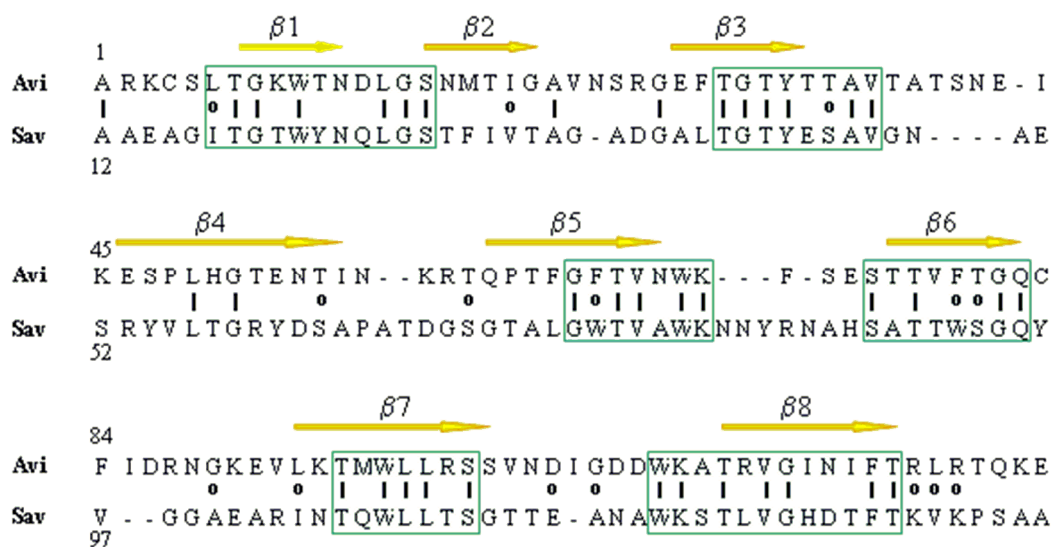


Figure I 3.10. Homologie entre l'avidine (Avi) et la streptavidine (Sav) : les flèches représentent les feuillets β , un trait vertical indique les résidus identiques, un point indique les résidus homologues, les zones qui présentent un fort taux d'identité sont encadrées.

Les différences majeures entre ces deux protéines se situent surtout au niveau des « loops » qui relient les feuillets β (figure I 3.11). A la différence de la streptavidine, l'avidine

est naturellement glycosylée et possède un pont disulfure intra-monomère entre les résidus cystéines C₄ et C₈₃.

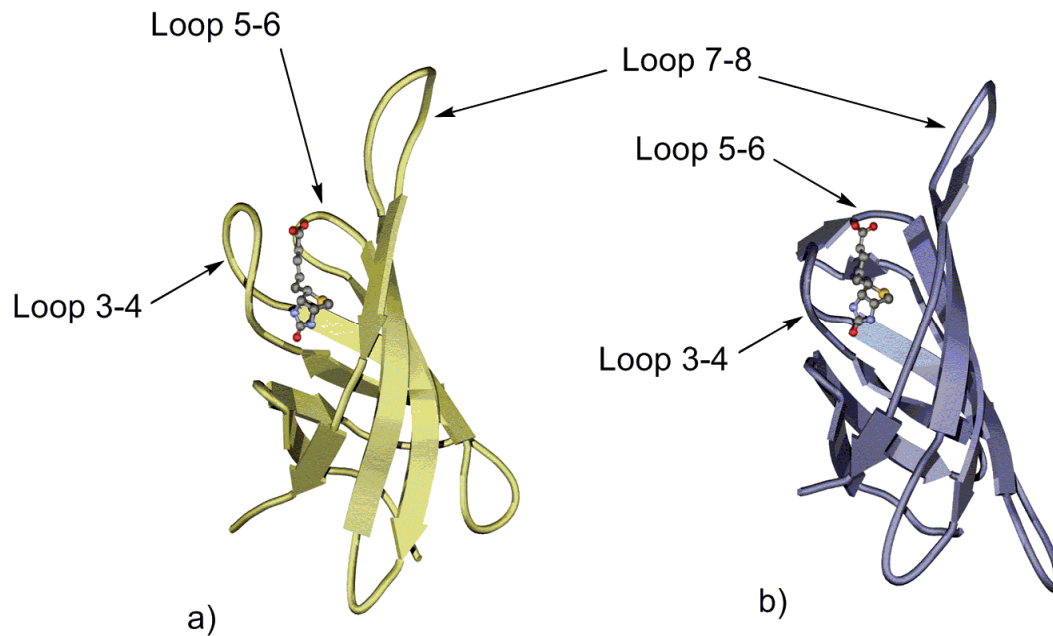


Figure I 3.11. Homologie structurale : a) en jaune un monomère de l'avidine contenant une biotine, b) en bleu un monomère de streptavidine contenant une biotine. Les 3 « loops » à proximité de la biotine sont indiqués.

3.3.3. Ancrage de la biotine : réseau de liaisons hydrogènes.

La forte affinité de la (strept)avidine pour la biotine et ses dérivés^[92] s'explique par des interactions hydrophobes et par un large réseau de liaisons hydrogènes autour de la biotine (figure I 3.12).^[83,91] Les liaisons hydrophobes sont assurées par des résidus tryptophanes et phénylalanines pour l'avidine (W70, F72, F79, W97 et W110) et par quatre tryptophanes pour la streptavidine (W70, W92, W108 et W120). Les liaisons hydrogènes stabilisant le site oxyanion de l'urée de la biotine sont grandement responsables de l'affinité, alors que les interactions au niveau du carboxylate sont secondaires.^[88]

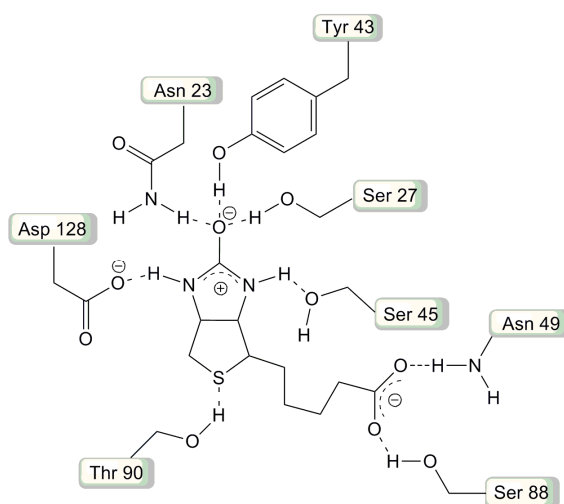


Figure I 3.12. Stabilisation de la biotine par réseau de liaisons hydrogènes. Stabilisation du site oxyanion de l'urée dans la streptavidine. (schéma basé sur ^[88,90])

La stabilité de ces deux protéines ainsi que la possibilité de modifier chimiquement le motif carboxylate de la chaîne valérique de la biotine, tout en conservant une grande affinité, sont des paramètres idéaux pour le développement de nouvelles technologies.^[87]

Les différentes applications qui en découlent portent sur la nanotechnologie (fixation sur support), le criblage de principes actifs, la mise au point de biosenseurs, des techniques de biologie moléculaire (amplification de signal) et la catalyse énantiosélective par les métalloenzymes artificielles.^[48,87]

3.4. L'alkylation allylique asymétrique au palladium.

L'alkylation allylique asymétrique catalysé au palladium est une méthode efficace pour les synthèses asymétriques. L'alkylation allylique asymétrique se distingue des autres méthodes catalytiques telles que l'hydrogénation et l'oxydation par sa capacité à former des

liaisons C-C. De plus, cette réaction a une large tolérance aux groupements fonctionnels et est réalisable dans des conditions de réactions douces.^[93]

3.4.1. L'alkylation allylique asymétrique par un complexe (phosphino-oxazoline)palladium.

Au début des années 90, Pfaltz et al.^[94] ont réalisé à l'aide des complexes (phosphino-oxazoline)palladium l'alkylation allylique asymétrique du substrat 1,3-diphényl-2-propényle acétate de façon hautement énantiosélective. Pour cette réaction, la réduction du substrat avec le diméthyl malonate comme nucléophile et le ligand de type phosphino-oxazoline produit un excès énantiomérique de 99% (figure I 3.13).

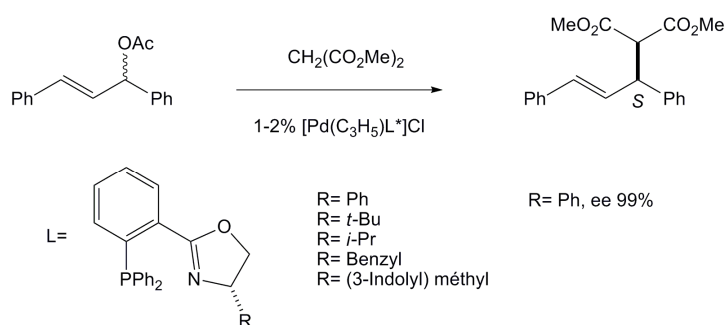


Figure I 3.13. Alkylation allylique asymétrique du 1,3-diphényl-2-propényl acétate par un complexe (phosphino-oxazoline)palladium.

3.4.2. Considérations mécanistiques et origines de l'énantiosélectivité de l'alkylation allylique.

Chaque étape du cycle catalytique, illustré dans la figure I 3.14, offre une possibilité d'induire l'asymétrie.^[95] L'étape de complexation est réversible, et en conséquence, le palladium peut complexer les deux faces π de l'oléfine.^[96] L'étape d'ionisation qui conduit au complexe intermédiaire π -allylpalladium peut être considérée comme une réaction S_N2 .^[97]

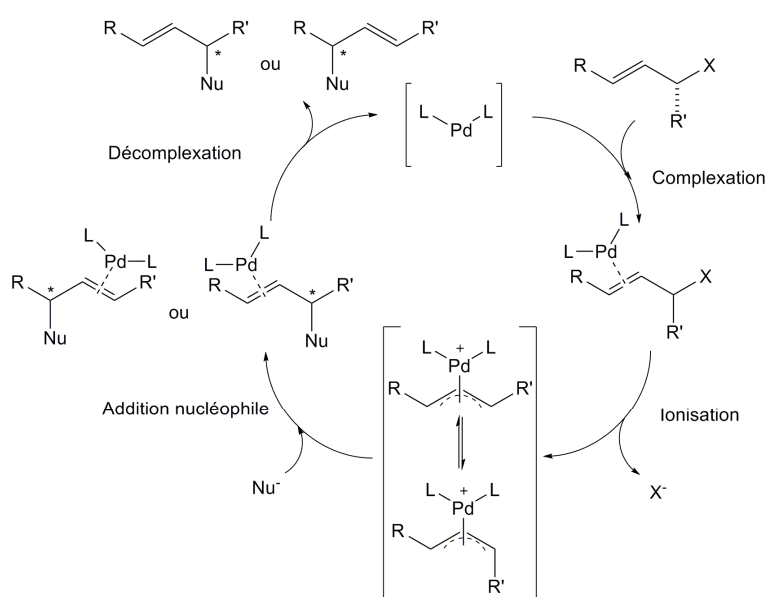


Figure I 3.14. Cycle catalytique de l'alkylation allylique asymétrique au palladium.

L'addition d'un nucléophile stabilisé ($pK_a < 20$) se produit avec une inversion de stéréochimie sur le carbone lié au palladium. Cette étape est aussi considérée comme une réaction S_N2 avec déplacement du palladium(II).

En général, les complexes π -allyles favorisent une addition sur le carbone le moins encombré pour minimiser les interactions stériques avec le nucléophile,^[98] bien que cette préférence puisse être modulée par les propriétés stériques et électroniques du complexe.^[99]

En effet, si on considère les propriétés stériques du complexe, les ligands encombrants tendent à favoriser une addition du nucléophile sur le carbone le plus substitué du système allylique pour minimiser les interactions entre les ligands et l'oléfine coordonnée (voie A de la figure I 3.15).

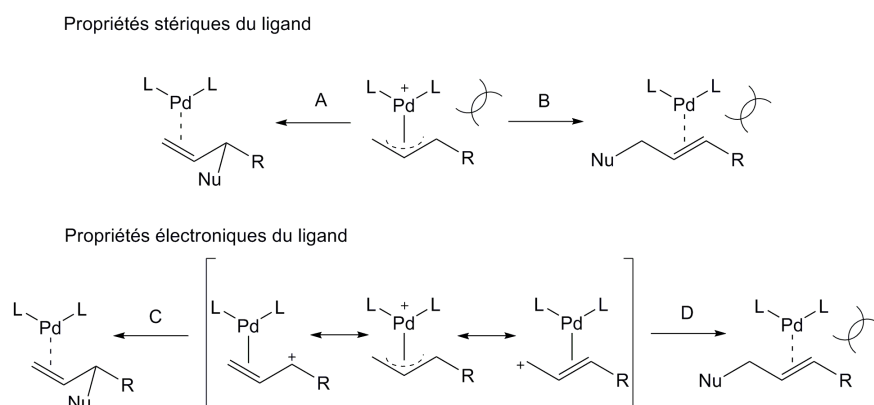


Figure I 3.15. Influence des propriétés stériques et électroniques des complexes sur l'addition nucléophile.

Si on considère les propriétés électroniques, les ligands avec une bonne acidité du système π augmentent le caractère cationique du système allylique par rétro-donation d'électrons π du métal sur le ligand π accepteur. Le complexe qui a le caractère cationique le plus stabilisé (carbone du système allylique le plus substitué) dirige l'addition du nucléophile sur ce carbone (voie C de la figure I 3.15). De plus, le palladium(0) est enrichi en électrons et préfère la coordination avec des oléfines plus pauvres en électrons. Elles favorisent l'addition sur le carbone le plus substitué du système allylique. A la différence, les réactions impliquant des ligands σ donateurs avec un faible encombrement stérique ont des interactions stériques et électroniques opposées privilégiant ainsi une addition du nucléophile sur le carbone le moins substitué du système allylique.

3.4.3. Les différents systèmes et leurs ligands utilisés en alkylation allylique asymétrique.

La figure I 3.16 présente une sélection de quelques ligands chiraux qui ont été utilisés dans les réactions d'alkylation allylique asymétrique catalysée au palladium. La plupart de ces ligands a été publiée dans les 20 dernières années.

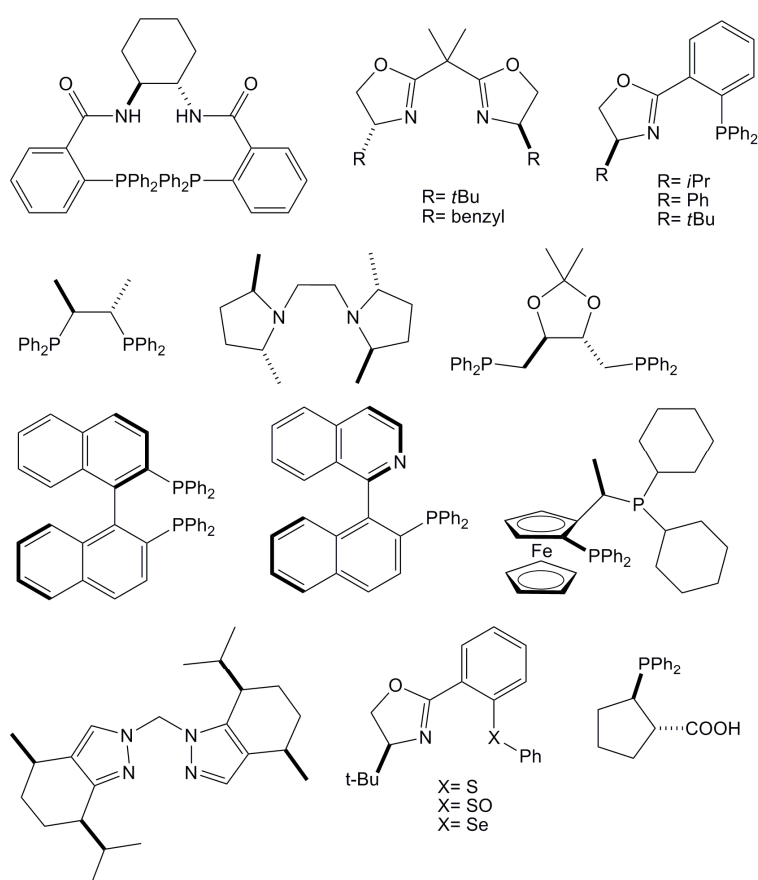


Figure I 3.16. Ligands chiraux utilisés en alkylation allylique.

L'importance des ligands diphosphines dans la chimie organométallique est le résultat de leur avantage à stabiliser le métal sous forme d'espèce monomérique tout en induisant le contrôle des propriétés stériques et électroniques du système.^[100] Le succès immédiat

rencontré par ces ligands chiraux dans les réactions d'hydrogénation a joué un rôle important dans leur utilisation pour les réactions d'alkylation allylique asymétrique. Pour optimiser le procédé, ces études ont été poursuivies, en utilisant de nouveaux ligands ciblés pour les réactions d'alkylation allylique. Lors de ces réactions, les différentes propriétés des atomes donneurs sont transmises au substrat allylique à travers le métal. Ainsi, la réactivité du substrat peut être affinée.^[101]

4. Troisième sphère de coordination : la nanotechnologie.

La « nanotechnologie » est la science émergente d'objets de l'ordre du nanomètre, qui sont intermédiaires en taille entre des grosses molécules et de petites structures qui peuvent être fabriquées par photolithographie.^[102] En chimie, cet ordre de grandeur a historiquement été associé aux colloïdes, micelles, polymères ou des agrégats d'un grand nombre de molécules. Plus récemment, les structures telles que les « nanorodes » de silicium ont émergé comme de nouvelles classes de nanostructures particulièrement intéressantes. En physique, la nanotechnologie est souvent associée à un comportement quantique et le comportement des électrons et des photons dans les structures nanoscopiques. En biologie et en biochimie, la nanotechnologie a aussi un profond intérêt dans les nanostructures comme composant de la cellule : beaucoup de structures, provenant de l'ADN et de virus extracellulaire, peuvent être considérées comme des nanostructures.^[103,104]

4.1. Considérations générales.

4.1.1. Historique.

En 1959, Richard Feynman (prix Nobel de physique en 1965) ouvre la voie à un domaine de recherche jusqu'alors inexploré.^[105] Se basant sur la taille minuscule des atomes, il considère comme faisable d'écrire de grandes quantités d'informations sur de très petites surfaces. Il anticipe la manipulation des atomes et l'agencement en structures cohérentes de très petite taille. De plus, il conçoit les moyens qui seraient mis en œuvre pour visualiser et manipuler les atomes. Les travaux pour la production de nanomachines ont entraîné l'amélioration des techniques telles que l'imagerie microscopique et ont été étendus à l'utilisation des systèmes biologiques.

4.1.2. Les applications industrielles.

Une grande partie des applications commercialisées se limite à l'utilisation d'une « première génération » de nanomatériaux passifs. Dans cette catégorie, on peut mentionner les nanoparticules de dioxyde de titane dans les crèmes solaires, cosmétiques et certains produits alimentaires ou des nanoparticules de fer dans l'emballage alimentaire.

« The Project on Emerging Nanotechnologies » recense les différents produits de consommation issus des nanotechnologies.^[106] En 2006, ce site nous indique que le principal secteur concerné est celui de la santé et des sports (vêtements, accessoires sportifs, cosmétiques, soins personnels, crème solaire,...), suivit de l'électronique et de l'informatique

(audio et vidéo, caméra et pellicules, hardware informatique, dispositifs mobiles et communications).

4.2. La microscopie.

La microscopie est un outil de choix pour étudier l'infiniment petit. Ainsi, le développement des nanotechnologies s'appuie sur le développement d'instruments de mesure. Ces nouvelles technologies permettent d'observer et de manipuler la matière à une échelle nanoscopique.

4.2.1. La microscopie à force atomique (AFM).

Le microscope à balayage par effet tunnel, développé par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer au début des années 80, est le précurseur de l'AFM. Ce développement leur a permis d'obtenir le prix Nobel de physique en 1986.^[107,108] La microscopie à force atomique est un type de microscope à très haute résolution avec une sonde à balayage. La résolution de l'AFM est de l'ordre du nanomètre, c'est-à-dire 1000 fois plus petit que la limite de diffraction optique. Ainsi, l'AFM est l'un des principaux outils utilisé pour imager, mesurer et manipuler les matériaux au niveau nanoscopique. Le principe de l'AFM est décrit dans la figure I 4.1.

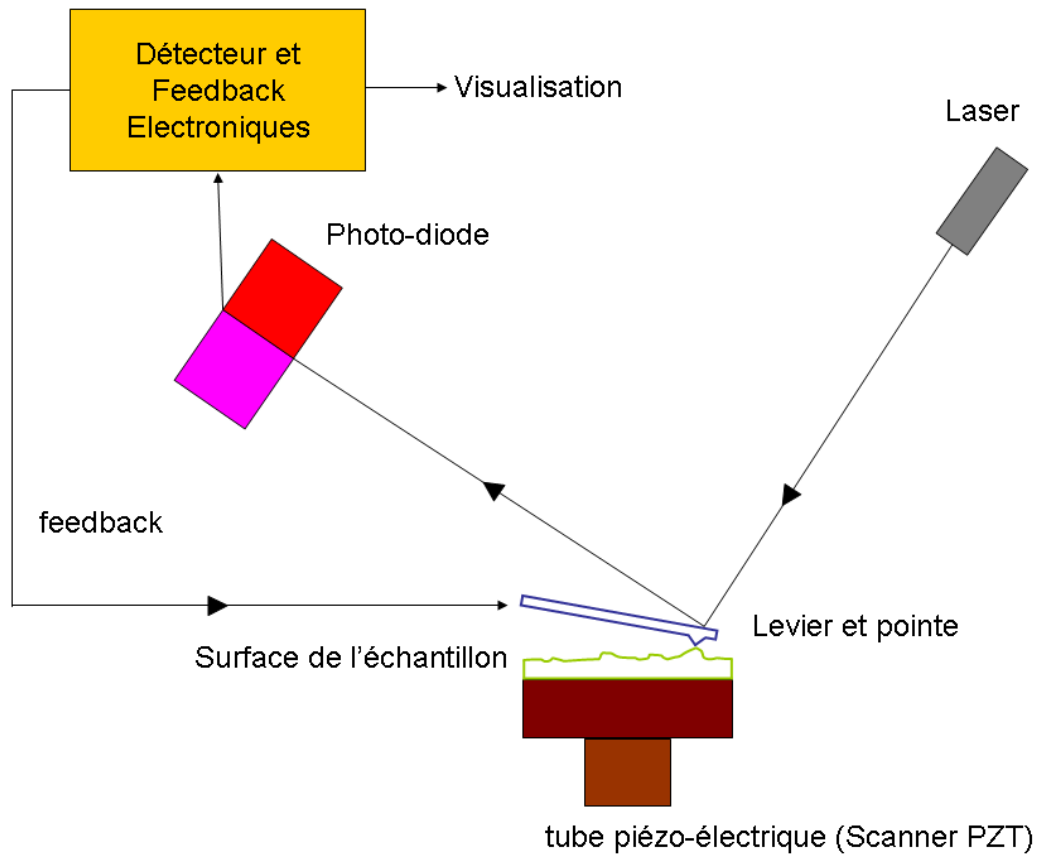


Figure I 4.1. Schéma explicatif de l'AFM et ses principes.

Le principe de l'AFM consiste en un balayage de l'échantillon grâce à un système de levier microscopique surmonté d'une pointe fine. Le levier et la pointe sont fabriqués en silicium ou en nitrure de silicium. Le rayon de courbure de la pointe détermine la précision de la mesure ; il est de l'ordre du nanomètre pour les pointes les plus fines. La déflexion est mesurée en utilisant un faisceau laser réfléchi sur le haut du levier sur une surface de photodiodes. Quand la pointe est portée à proximité de la surface de l'échantillon, les forces entre la pointe et l'échantillon induisent la déflexion créée par l'angle d'inclinaison du levier suivant la loi de Hooke. Dépendant de la situation, les forces qui sont mesurées en AFM incluent les forces mécaniques de contact, les forces de Van der Waals, les forces capillaires, les liaisons chimiques, les forces électrostatiques, les forces magnétiques, les forces de Casimir et les forces de solvation. Si la pointe balaye la surface de l'échantillon à une

hauteur constante il y a un risque d'endommager la pointe. Ainsi, le mécanisme de feedback est employé pour ajuster la distance et pour maintenir une force constante entre la pointe et l'échantillon.

De plus, l'échantillon est monté sur un tube piézo-électrique (scanner PZT) qui déplace l'échantillon suivant les directions x, y et z pour maintenir une force constante. Tous ces mécanismes permettent l'obtention d'une carte qui caractérise la topographie de l'échantillon et qui correspond à l'aire S du support.

4.2.2. La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM : « Scanning Electronic Microscopy »).

Le MEB est une technique de microscopie électronique basée sur le principe des interactions électrons-matière capable de produire des images à haute résolution.

Le pouvoir de résolution de l'œil humain et du microscope optique est limité par la longueur d'onde de la lumière visible et la qualité des lentilles grossissantes pour le microscope. En effet, les plus puissants microscopes optiques peuvent distinguer des détails de 0.1 à 0.2 μm . Si l'on veut observer des détails plus fins, il faut diminuer la longueur d'onde qui sert à éclairer les cibles. Dans le cas des microscopes électroniques, les photons ne sont pas utilisés. Ils sont remplacés par les électrons qui ont des longueurs d'ondes associées beaucoup plus faibles.

Un microscope électronique à balayage est essentiellement composé d'un canon à électrons, d'une colonne électronique dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon, d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les trois directions et des détecteurs permettant de collecter et d'analyser les rayonnements émis

par l'échantillon. En outre, l'appareil doit nécessairement être équipé d'un système de pompe à vide.

La figure I 4.2 illustre une représentation schématique d'un MEB. Le principe consiste en la projection d'un faisceau d'électrons sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre la sonde électronique et l'échantillon génère des électrons secondaires de basse énergie, qui sont accélérés vers un détecteur qui amplifie le signal. A chaque point d'impact correspond un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact, qui détermine le rendement en électrons secondaires, et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

Les lentilles jouent le même rôle vis-à-vis du faisceau d'électrons que des lentilles conventionnelles ou photoniques dans un microscope optique. Des bobines disposées selon les deux axes perpendiculaires à l'axe du faisceau et parcourues par des courants synchronisés permettent de soumettre la sonde à un balayage du même type que celui de la télévision. Les lentilles électroniques, qui sont généralement des lentilles magnétiques et les bobines de balayages forment un ensemble que l'on appelle la colonne électronique.

Dans les MEB modernes, la cartographie d'électrons secondaires est enregistrée sous forme numérique. Pourtant cette technologie a pu être développée dès le début des années 60, bien avant la diffusion des moyens de stockage informatique, grâce à un procédé analogique qui consistait en la synchronisation du faisceau issu d'un tube cathodique avec celui du MEB, en modulant l'intensité du tube par le signal secondaire. L'image de l'échantillon apparaissait alors sur l'écran phosphorescent du tube cathodique et pouvait être enregistrée sur une pellicule photographique.

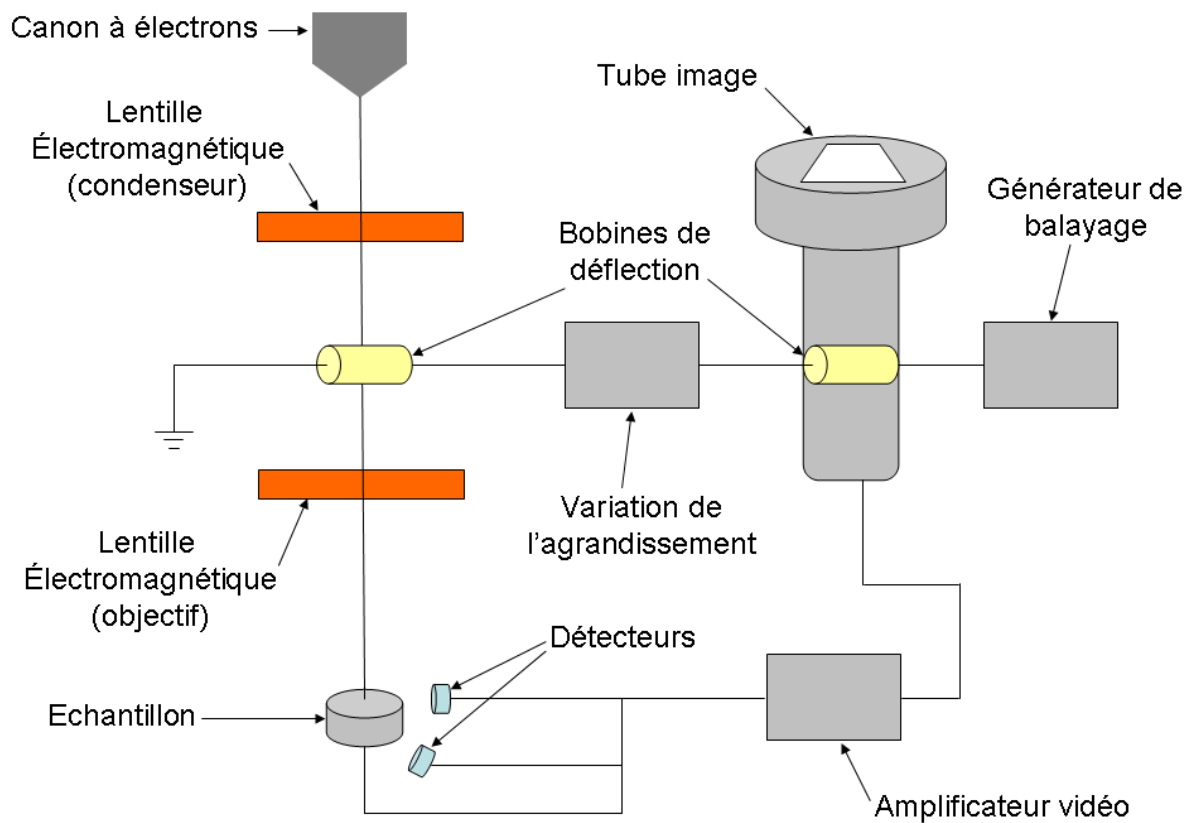


Figure I 4.2. Schéma explicatif du MEB et de ses principes.

4.3. Exemples de systèmes développés en nanotechnologie.

Deux exemples sont présentés ci-dessous pour montrer la voie choisie par notre groupe pour développer des systèmes nanoscopiques.

4.3.1. « Metal Organic Frameworks ».

Les « Metal Organic Frameworks » (MOFs) sont des composés cristallins, comprenant un ion métallique ou un cluster, coordonné le plus souvent à des molécules organiques rigides

pour former des structures 1D, 2D ou 3D. Ces composés peuvent être poreux.^[109] Dans les cas où les pores sont assez stables, ils peuvent être utilisés dans l'élimination de molécules hôtes (souvent des molécules de solvants) et dans le stockage de gaz comme l'hydrogène ou de dioxyde de carbone. La banque de donnée de Cambridge avait reportée en 2005 plus de 12000 de ces structures.^[110]

Le groupe de Yaghi^[109,111] est l'un des pionniers dans ce domaine grâce au développement d'un grand nombre de MOFs. Par un screening à haut débit, ils ont reporté plus de 25 structures de types zéolithes imidazolates (ZIF : « zeolithe imidazolate frameworks ») (figure I 4.3).

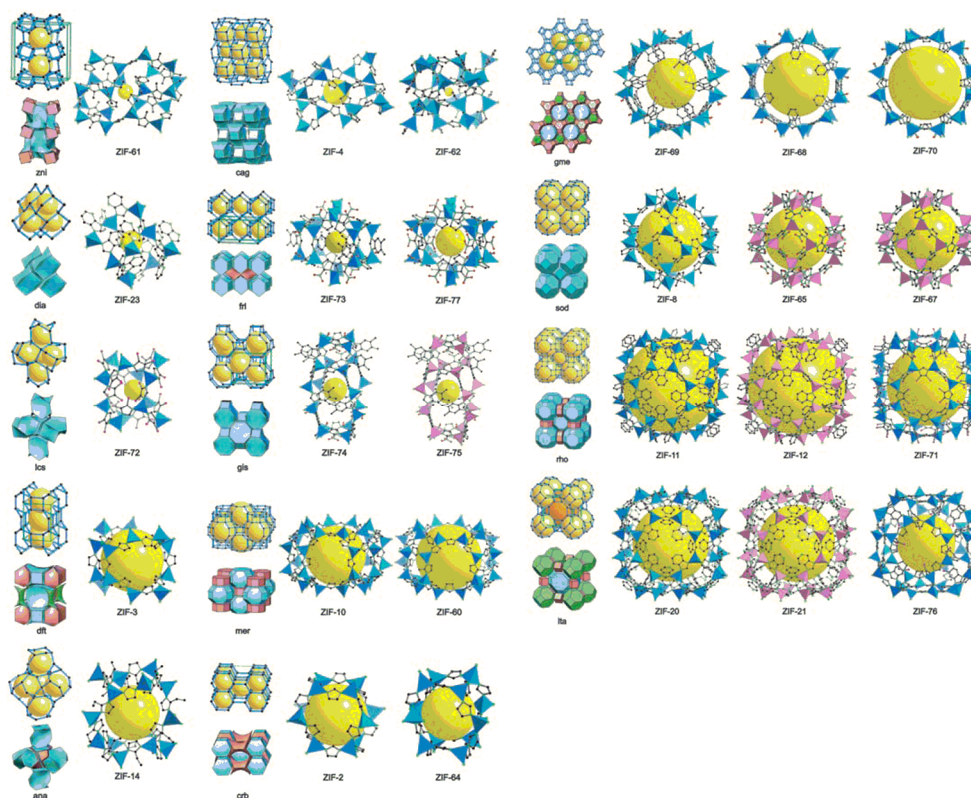


Figure I 4.3. Représentation des cristaux de ZIF. Chaque rang montre le réseau (dessins des lignes bleu et points noirs) empilé sur le haut des carreaux représentant les subdivisions de l'espace (les différentes formes polyédrales colorées), dans le réseau noté avec les trois lettres symboles du réseau, suivant la structure XRD d'un mono-cristal du ZIF correspondant à chacun des réseaux. La plus large

des cages dans chaque ZIF est représentée avec un tétraèdre de ZN_4 en bleu et CON_4 en rose. La sphère jaune est placée dans la structure pour indiquer l'espace libre à l'intérieur des cages. Les atomes d'hydrogène ont été masqués. Les imidazolates ou molécules types imidazolates sont représentées en boule et bâton (C, noir ; N, vert ; O, rouge ; Cl, rose)(image tirée de la publication^[111]).

4.3.2. Nanostructure : auto-assemblage d'agrégats d'immunoglobuline GS.

En 2004, Whitesides et al.^[112] décrivent une méthode basée sur les propriétés d'auto-assemblage antigène-anticorps pour générer des clusters d'or. L'association d'immunoglobuline GS (IgGs) avec des antigènes bivalents forme des oligomères (dimère, trimère ou tétramère) qui servent de support (« patron ») pour la croissance des nanoparticules à partir de centres redox (aldéhydes) présents sur l'IgGs. Cette méthode combine une reconnaissance moléculaire avec des groupes fonctionnels redox sur une biomolécule pour former localement une série de nanoparticules (figure I 4.4)

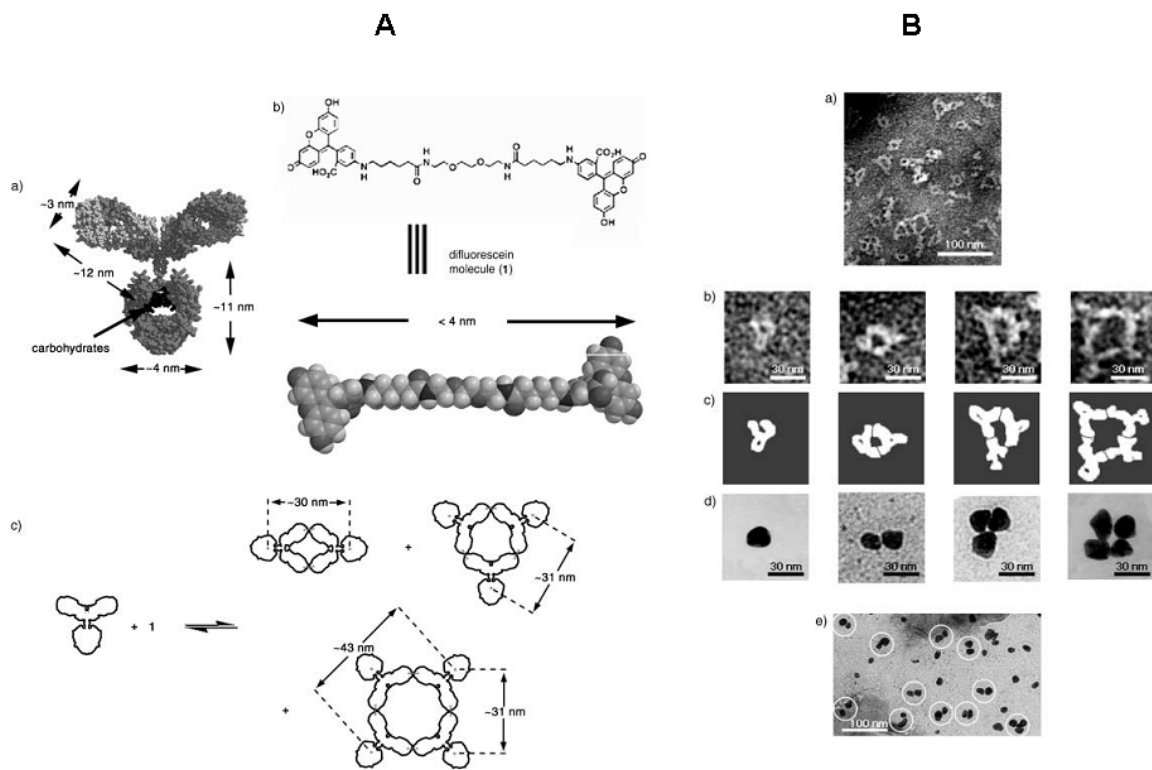


Figure I 4.4. La partie A la figure représente l'IgGs(a), l'antigène bivalent (b) et enfin les oligomères formés en mélangeant les deux (c). La partie B la figure, représente les images TEM (microscope électronique à transmission), présent des oligomères de IgGs (a, b, c) et les nanoparticules formés (d, e) (images tirées de la publication^[112]).

Les nanoparticules de différentes formes (rectangle, étoile, octaèdre, etc...),^[113-115] compositions (métalliques ou minérales)^[116] et l'arrangement des clusters (formant de petits agrégats ou des couches larges)^[117,118] sont intéressantes non seulement pour leurs potentiels d'utilisation et la miniaturisation des dispositifs électroniques ou optiques (détecteurs optiques, câble conducteur, etc...).

Chapitre II : Première sphère de coordination :

Hydrogénation énantiosélective de substrats β -cétoesters précurseurs de la Carnitine.

1. Introduction.

1.1. Hydrogénation asymétrique des β -cétoesters.

Un grand nombre de molécules chirales sont produites à partir d'alcools optiquement actifs et fonctionnalisés. Au cours de ces dernières années, leurs synthèses ont été publiées et patentées par de nombreux groupes ou sociétés.^[1] Dans ce contexte, l'hydrogénation catalytique énantiosélective de β -cétoesters, comme intermédiaires réactionnels très utilisés pour la synthèse de molécules biologiquement actives ainsi que de produits naturels, apparaît comme une méthode de choix. Les travaux pionniers en la matière ont été réalisés dans les années 80 par le groupe de Noyori avec l'utilisation de complexe ruthénium et du ligand binap.^[119,120] D'autres groupes ont par la suite développé d'autres ligands afin d'élargir le champ d'action de cette réaction à d'autres substrats. On peut citer entre autres les travaux de : Genêt,^[41,121,122] Spindler,^[123,124] Imamoto,^[125] Knochel,^[126] Zhang,^[127] et Beller.^[128]

La première grande classe de ligands a été développée par Noyori avec le binap et ses dérivés.^[119] Il s'agit de ligand diphosphine triaryle bidentate de symétrie axiale C_2 . Par la suite, de nombreux autres ligands triaryles ont été utilisés tel que : le synphos,^[40] le

solphos,^[129] le difluorophos,^[121] le soniphos,^[130] et enfin la série des tunephos (Figure I 2.12 et Figure II 2.4).^[131]

Des ligands diphosphines dialcyle de symétrie C₂ dérivés du duphos^[132] ont également été développés, tout comme les ligands phospholanes ou bien encore les ligands férrocényle.^[124]

Plus récemment, Beller,^[128] Reetz,^[133,134] Feringa,^[135,136] Pringle^[137] et d'autres^[138] ont proposé l'utilisation de ligands monodentates en association avec différents métaux tels que le ruthénium, l'iridium ou le rhodium pour la réduction énantiosélective de β -cétoesters.

1.2. La carnitine.

La synthèse de la carnitine a évolué parallèlement au développement de nouveaux ligands. En effet, la synthèse énantiosélective de la carnitine par l'hydrogénation catalytique du substrat 4-chloro-3-oxobutanoate d'éthyle (CAAet) suivie de l'introduction du groupement ammonium, a été décrite pour la première fois par Noyori à la fin des années 80.^[119] Une excellente énantiosélectivité de 99% est reportée en utilisant le RuX₂binap (X=halogène) comme catalyseur. L'autre voie de synthèse possible est l'hydrogénation de l'ester d'éthyle de la carnitone.^[139] Les deux substrats sont présentés dans la figure II 1.1.

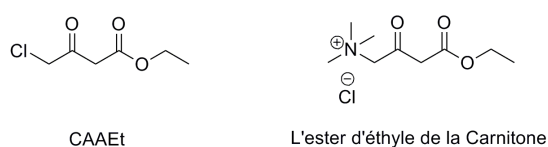


Figure II 1.1. Structure des substrats précurseurs de la carnitine.

Dans le corps humain, la carnitine est biosynthétisée à partir de deux acides aminés, la lysine et la méthionine. La (*R*)-carnitine est responsable du maintien du métabolisme énergétique dans les cellules de l'organisme : elle transporte les acides gras à travers la membrane des cellules jusque dans les mitochondries où ils sont « brûlés » pour être transformé en énergie. La (*R*)-carnitine peut-être employée pour diminuer le niveau de triglycérides dans le sang. Elle intervient dans la prévention de certaines maladies cardiovasculaire, notamment l'arythmie cardiaque. Elle aide à perdre du poids lorsque la supplémentation est combinée à un régime pauvre en glucides. Elle accroît naturellement le niveau d'énergie. Enfin, elle améliore significativement les performances d'endurance des sportifs et réduit le stress musculaire occasionné par l'exercice.^[140]

L'autre énantiomère obtenu de l'hydrogénation du CAAEt et de l'ester d'éthyle de la carnitine est utilisée comme chaîne latérale dans la synthèse des statines (ou inhibiteurs de la 5-hydroxy-3-méthyl-glutaryl CoA réductase) qui forment une classe d'hypolipémiants, utilisés comme médicaments. Les statines comprennent la fluvastatine, la lovastatine, la pravastatine, la rosuvastatine et la simvastatine. Ces molécules réduisent le taux de cholestérol dans le sang. Elles peuvent être utilisées dans la diminution du risque de survenue ou de récurrence de maladies résultant du rétrécissement ou de l'occlusion d'artères (infarctus du myocarde, angine de poitrine, artériopathie oblitérante des membres inférieure, accident vasculaire cérébral). Un effet préventif est aussi suspecté dans de nombreuses autres maladies, mais il reste à être formellement démontré. C'est le cas notamment de la prévention de l'insuffisance cardiaque, des cancers (dont ceux du colon ou ceux des poumons), de la réduction de la progression du diabète, de la prévention des thromboses veineuses profondes (phlébites), ou encore de la prévention de la démence.^[141,142]

Le but de la collaboration avec la compagnie Lonza sur une de leurs molécules cibles les plus importantes, la carnitine, a été de tester l'hydrogénation de deux substrats (CAAEt et

l'ester d'éthyle de la carnitone) dans des conditions dites « douces » (faible température et basse pression d'hydrogène).^[39,122,126,127,143-151] (Figure II 2.1)

2. Réaction d'hydrogénation catalytique en phase homogène.

2.1. Considérations générales.

Afin de réaliser l'hydrogénation catalytique de β -cétoester, il est nécessaire de définir toutes les composantes de la catalyse. La transformation est présentée dans la figure II 2.1.

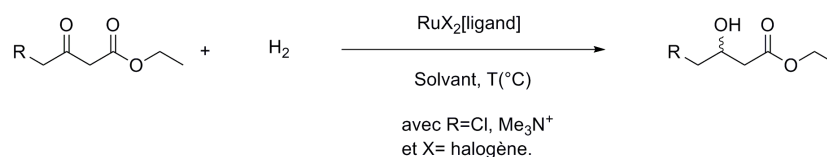


Figure II 2.1. Réduction des β -cétoester par hydrogénation asymétrique énantiosélective.

Les deux substrats utilisés pour cette réaction sont le CAAEt et l'ester d'éthyle de la carnitone. Pour la préparation des complexes ruthénium-diphosphine, les dimères de ruthénium halides sont communément utilisés. La structure générale des précurseurs employés est présentée dans la figure II 2.2.

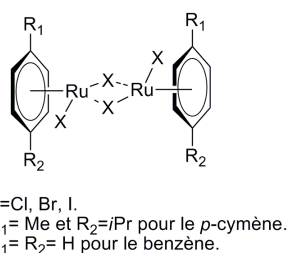


Figure II 2.2. Représentation générale de précurseurs métalliques de dimère du ruthénium.

Plusieurs types de précurseurs métalliques peuvent être utilisés avec différents halogènes (chlore, brome ou iode) ou différents η^6 -arènes (benzène ou *p*-cymène). Afin de simplifier le protocole expérimental en vue d'une application industrielle, le complexe actif est préparé *in situ* par réaction entre le dimère de ruthénium et un ligand diphosphine, puis utilisé directement en catalyse.

La plupart des ligands utilisés dans le cadre de ce projet sont les ligands diphosphines de type triaryles atropoisomériques.

Pour cette réaction, un large éventail de solvants peut être utilisé, pouvant aller des solvants protiques, tel que l'éthanol ou le méthanol ou bien des solvants aprotiques polaires comme le tétrahydrofurane ou le dichlorométhane.^[136] De plus, le mélange de solvant (éthanol et dichlorométhane) est connu pour apporter une amélioration de l'énantiosélectivité.^[127]

Dans le cas de l'utilisation d'un substrat β -cétoester avec un groupement ester éthylique, il est préférable d'utiliser l'éthanol comme solvant principal de la réaction pour éviter la formation de sous-produits dûs à la transesterification.

Pour la réduction de la liaison cétone du β -cétoester, de nombreux exemples de la littérature montrent une meilleure activité et une meilleure énantiosélectivité pour des pressions d'hydrogène de l'ordre de 100 bars et des températures pouvant aller jusqu'à 120°C.

Pour ce projet, un réacteur d'hydrogénation a été conçu afin de pouvoir travailler dans ces conditions de température et de pression. (Figure II 2.3)



Figure II 2.3. Multi-réacteur 20 puits avec un système de reflux et une entrée de gaz inerte (azote ou argon).

Le but du projet étant de travailler pour des raisons économiques dans des conditions de température et de pression « douces », une partie des réactions se fera à 50 bars et 60°C.

2.2 Les ligands pour l'hydrogénation asymétrique.

La plupart des ligands diphosphines ont été achetés auprès de compagnies telles que Sigma-Aldrich, Strem ou généreusement donnés par des compagnies productrices de ligands telles que Solvias ou Bayer. Les différents ligands utilisés pour cette réaction sont présentés dans la figure II 2.4.

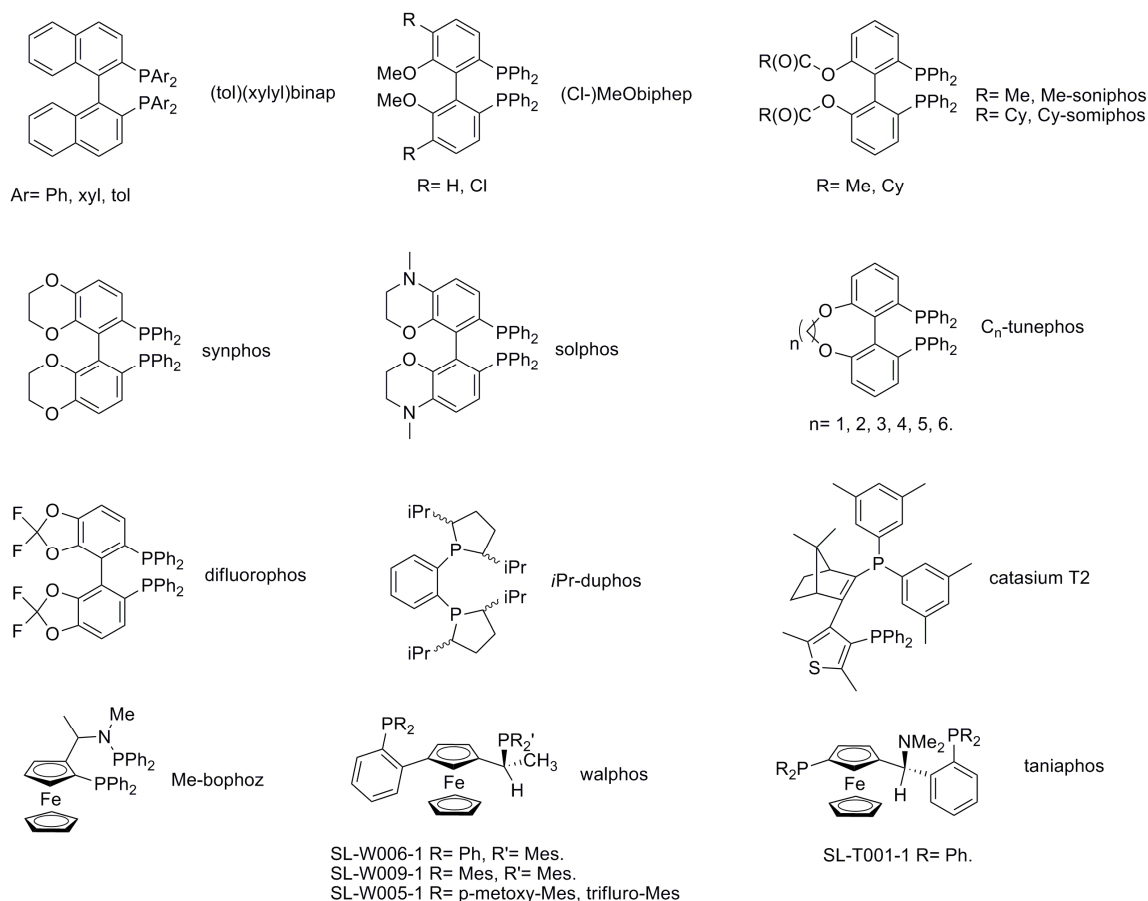


Figure II 2.4. Structure des ligands.

Ces ligands forment une bibliothèque de composés qui ont été testés en hydrogénation catalytique des deux substrats β -cétoesters.

2.3. Mise en place de la catalyse.

La réaction d'hydrogénation étant sensible à l'oxygène, toutes les étapes de préparation de la catalyse sont faites sous atmosphère inerte à l'intérieur d'une boîte à gants. Les phosphines utilisées étant assez stables vis-à-vis de l'oxygène, leur pesée se fait à l'air libre. Les solutions du substrat CAAEt et d'éthanol utilisées, sont préalablement dégazées par un flux continu d'azote pendant 2 h.

Pour le substrat CAAEt, les conditions type de réaction sont : un rapport substrat/catalyseur de 2000/1 (la concentration finale du substrat lors de la catalyse est de 1.8 M), utilisation de l'éthanol comme solvant, avec une température de 60°C, 50 bars de pression d'hydrogène et 2 h de réaction.

Pour le substrat l'ester d'éthyle de la carnitone, les conditions types de réaction utilisées sont : un rapport substrat sur catalyseur de 100 pour 1 (pour une concentration finale du substrat de 0.7 M), utilisation de l'éthanol comme solvant à 100°C, 50 bars de pression d'hydrogène et 2 h de réaction.

Après préparation, les vials sont déposés dans le multi-réacteur, celui-ci est fermé. Le réacteur est sorti de la boîte à gants et connecté au système d'hydrogénation. L'azote est progressivement remplacé par de l'argon par plusieurs cycles de charge du réacteur (« pressure and release »). Le réacteur est mis sous pression d'hydrogène selon le même principe de charge. Une fois la température atteinte, la réaction est mise sous agitation pendant 2 h.

En fin de réaction, le réacteur est ramené à température ambiante et à pression atmosphérique, un aliquot de 5 µL de chaque réaction est prélevé et injecté en GC sur colonne Lipodex-E.

2.4. Reproductibilité des résultats.

Avant de passer au criblage des ligands pour la catalyse, il est nécessaire de s'assurer de la reproductibilité des résultats. Pour cela, une série d'expériences a été effectuée dans le multi-réacteur construit et dans les conditions opératoires choisies (détaillés dans la figure II 2.5).

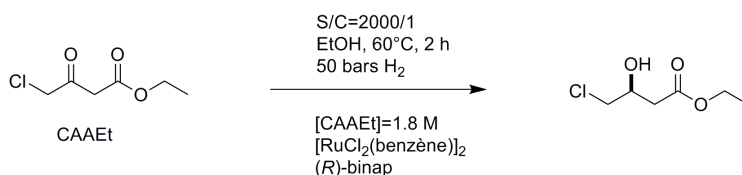


Figure II 2.5. Conditions de réactions typiques pour la catalyse d'hydrogénation du CAAEt.

Le couple ligand binap et précurseur métallique $[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$ a été sélectionné comme catalyseur référence. Le CAAEt est pris comme substrat pour ce test et la réaction se fait dans l'éthanol sous 50 bars d'hydrogène à une température de 60°C.

Les échantillons de la catalyse sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (GC) avec une colonne chirale de type Lipodex-E. Les chromatogrammes ne montrent pas de produits de dégradation mais uniquement le substrat et les deux énantiomères.

La réaction a été répétée à plusieurs reprises. Les résultats obtenus donnent une conversion variant de 27 à 32% et un excès énantiomérique variant de 85.8 à 87.8%. Ces variations étant faibles, la reproductibilité des résultats est suffisante pour le criblage de toutes les conditions réactionnelles nécessaires à la réalisation de ce projet.

2.5. Evaluation du système catalytique avec différents ligands à 100°C.

La réaction d'hydrogénation énantiosélective des β -cétoesters avec du ruthénium se réalise à des températures élevées, typiquement aux alentours de 80°C.^[119,148] Ceci est également vrai pour le substrat CAAEt. Une série d'expériences a été réalisée à 100°C. Pour celle-ci, le ligand est pris en léger excès par rapport au métal (rapport ligand/métal, L/M = 1.05), tandis qu'un « loading » de 0.2% de ruthénium a été utilisé (rapport substrat/catalyseur, S/C = 2000). Les résultats avec une énantiosélectivité supérieure à 90% sont listés dans le tableau II 2.1.

Tableau II 2.1. Hydrogénation asymétrique du substrat CAAEt à 100°C.

Entrée ^[a]	Ligand	Conv. (%)	ee (%)
1 ^[b]	(<i>R</i>)-binap	29.7	(<i>S</i>) 86.6
2	(<i>R</i>)-binap	100	(<i>S</i>) 94.5
3	(<i>S</i>)-difluorophos	100	(<i>R</i>) 98.8
4	(<i>S</i>)-Cy-soniphos	100	(<i>R</i>) 98.3
5	(<i>S</i>)-Cl-MeO-biphep	100	(<i>R</i>) 97.9
6	(<i>S</i>)-Me-soniphos	100	(<i>R</i>) 97.3
7	(<i>R,R</i>)- <i>i</i> Pr-duphos	20.5	(<i>R</i>) 95.5
8	(<i>S</i>)-MeO-biphep	100	(<i>R</i>) 94.2
9	(<i>S</i>)-synphos	100	(<i>R</i>) 93.0
10	(<i>S</i>)-tol-binap	100	(<i>R</i>) 92.3
11	(<i>S</i>)-3,5-xylyl-binap	100	(<i>R</i>) 90.6

Conditions de réaction : ^[a] [CAAEt]=1.8 M dans EtOH ; S/C=2000 ; [RuCl₂(benzène)]₂ ; P(H₂)=50 bars ; 100°C ; 2 h ; L/M=1.05, ^[b] réaction réalisée à 60°C.

A plus haute température (100°C), le ligand (*R*)-binap donne une meilleure énantiosélectivité et une meilleure conversion si l'on compare les entrées 1 et 2 (86.6% ee (29.7% de conversion) à comparer avec 94.5% ee (100% de conversion)). De manière générale, tous les ligands testés à cette température (100°C) donnent une conversion totale, hormis pour le ligand (*R,R*)-*i*Pr-duphos (entrée 7). Cela confirme le fait que l'hydrogénation des β -cétoesters est plus efficace à des températures plus élevées et avec des ligands de type triarylphosphines.

Le ligand difluorophos donne la meilleure énantiosélectivité avec 98.8% ee. Les ligands Cy- et Me-soniphos sont également très énantiosélectifs avec respectivement 98.3% et 97.3% ee. En comparaison, les ligands type binap enrichi en électrons (tol- et xyl-binap) sont moins énantiosélectifs. Deux facteurs peuvent influencer l'énantiosélectivité de la réaction. Il

s'agit des propriétés stériques et du caractère acide des phosphines.^[41] Le ligand répondant le mieux à ces deux facteurs est le difluorophos. En effet, il possède le plus faible angle diédral. Le caractère acide de ces diphosphines est le plus important grâce à la présence sur les chaînes latérales d'atomes de fluor.

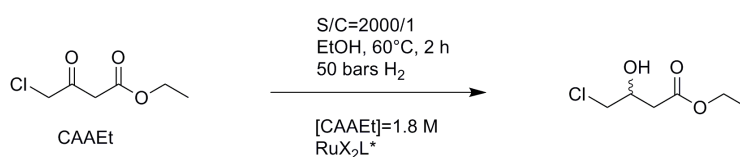
Une meilleure conversion et une meilleure énantiosélectivité sont obtenues à 100°C. Ces résultats offrent une confirmation de la bonne reproductibilité des résultats, comparables à ceux de la littérature.

2.6. Identification du meilleur précurseur métallique.

Dans le but de sélectionner le précurseur métallique offrant une meilleure activité en utilisant une formation *in situ* du catalyseur, plusieurs dimères de ruthénium disponibles commercialement ont été testés avec une sélection de ligands dans des conditions standard de réaction.

Les résultats de ces réactions avec les ligands MeO-biphep, binap, tol-binap et solphos sont présentés dans le tableau II 2.2.

Tableau II 2.2. Evaluation de l'activité de différents précurseurs métallique au ruthénium en combinaison avec plusieurs ligands chiraux pour la réduction du substrat CAAEt.



Entrée	Précurseur catalytique	Ligand	Conv. (%)	ee (%)
1	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>R</i>)-MeO-biphep	21.3	(<i>S</i>) 84.6
2	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>R</i>)-binap	29.9	(<i>S</i>) 86.7
3	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>S</i>)-tol-binap	26.8	(<i>R</i>) 78.3
4	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>R</i>)-solphos	40.3	(<i>S</i>) 68.7
5	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>R</i>)-MeO-biphep	5.8	(<i>S</i>) 86.8
6	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>R</i>)-binap	7.9	(<i>S</i>) 91.1
7	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>S</i>)-tol-binap	18.8	(<i>R</i>) 88.0
8	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>R</i>)-solphos	55.1	(<i>S</i>) 74.0
9	RuCl ₃ · <i>n</i> H ₂ O	(<i>R</i>)-MeO-biphep	11.9	(<i>S</i>) 82.0
10	RuCl ₃ · <i>n</i> H ₂ O	(<i>R</i>)-binap	10.1	(<i>S</i>) 82.5
11	RuCl ₃ · <i>n</i> H ₂ O	(<i>S</i>)-tol-binap	22.4	(<i>R</i>) 76.9
12	RuCl ₃ · <i>n</i> H ₂ O	(<i>R</i>)-solphos	12.7	(<i>S</i>) 72.1
13	[RuI ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>R</i>)-MeO-biphep	0	-
14	[RuI ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>R</i>)-binap	0	-
15	[RuI ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>S</i>)-tol-binap	0	-
16	[RuI ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>R</i>)-solphos	0	-

D'après les résultats obtenus, une échelle d'activité peut-être établie [RuCl₂(benzène)]₂ > [RuCl₂(*p*-cymène)]₂, RuCl₃·*n*H₂O >> [RuI₂(*p*-cymène)]₂. Dans ces conditions, aucune réaction ne donne une conversion totale. Cependant, de grandes différences de réactivité ont été observées en fonction des précurseurs du ruthénium utilisés. Il semble que les précurseurs possédant des atomes chlores comme halogènes donnent de meilleurs résultats comparativement au précurseur [RuI₂(*p*-cymène)]₂. Dans ce cas, on suppose que l'entité catalytique active ne se forme pas, étant donné qu'aucune conversion

n'est détectée en GC. L'arène joue également un rôle important dans la réactivité. Le complexe réalisé à partir du dimère de benzène présente une meilleure activité que le complexe comportant le *p*-cymène, bien que le ligand (*R*)-solphos constitue une exception (entrées 4 et 8).

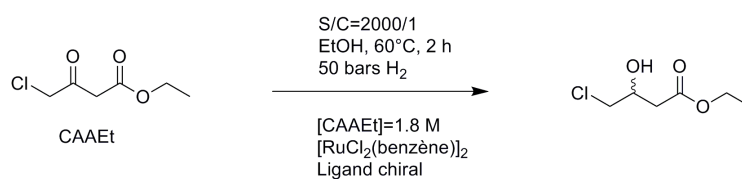
Quelques essais ont été réalisés avec des précurseurs au rhodium et iridium. Aucun produit de la réaction n'est détecté en GC pour le précurseur à l'iridium et moins de 5% de conversion sont observés pour le précurseur au rhodium. L'activité pour ces deux précurseurs étant très faible, voire nulle, aucune autre investigation supplémentaire n'a été entreprise.

Basé sur ces résultats, le $[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$ a été sélectionné pour le criblage systématique de toute la librairie de ligands. De part une énantiosélectivité légèrement meilleure, les résultats les plus intéressants obtenus avec le $[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$ ont aussi été testés avec le $[\text{RuCl}_2(p\text{-cymène})]_2$.

2.7. Identification des différents ligands.

Afin d'évaluer l'activité des différents ligands à notre disposition (voir figure II 2.4), une catalyse a été réalisée avec le précurseur métallique $[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$. Les résultats sont présentés dans le tableau II 2.3.

Tableau II 2.3. Evaluation des différents ligands en présence de $[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$ comme précurseur.



Entrée	Ligand	Conv. (%)	ee (%)
1	(<i>R</i>)-binap	29.9	(<i>S</i>) 86.7
2	(<i>R</i>)-MeO-biphep	21.3	(<i>S</i>) 84.6
3	(<i>S</i>)-Me-soniphos	6.3	(<i>R</i>) 95.7
4	(<i>S</i>)-synphos	4.2	(<i>R</i>) 90.8
5	(<i>R</i>)-solphos	40.3	(<i>S</i>) 68.7
6	(<i>S</i>)-C ₁ -tunephos	28.3	(<i>R</i>) 90.1
7	(<i>S</i>)-difluorophos	< 2.0	-
8	(<i>R,R</i>)- <i>i</i> Pr-duphos	< 1.0	-
9	Catasium T ₂	16.5	(<i>S</i>) 47.0
10	(<i>R</i>)-Me-bophoz	< 2.0	-
11	SL-W009-1	89.4	(<i>S</i>) 78.8
12	SL-T001-1	94.8	(<i>S</i>) 84.5

Les meilleures énantiosélectivités sont obtenues pour les ligands triaryles de symétrie axiale C₂ (entrées 3, 4 et 6). Pour la plupart des ces ligands, la conversion reste modeste et inférieure à 50% (entrées 1 à 8) et, surtout inférieure au binap (entrée 1). Elle est même très faible dans le cas du ligand difluorophos (entrée 7).

Les meilleures conversions sont obtenues pour des ligands de type férrocényle (entrées 11 et 12). Cependant, l'excès énantiomérique obtenu pour ces ligands reste modeste (ee < 85%).

Dans le cas des ligands de type bis-dialkylphosphines, la conversion est nulle (entrée 8). Il semble que la faible température de réaction ne favorise pas leur utilisation.

De manière générale, les ligands triaryles de symétrie axiale C_2 réagissent mieux dans des conditions douces de température et de pression (60°C et 50 bars d'hydrogène). Par conséquent, ce type de ligand a été choisi pour la suite des expériences.

3. Résultats du criblage.

3.1. Hydrogénation du substrat CAAEt.

3.1.1. Etude des complexes donnant la meilleure activité.

Tous les ligands présentés dans la figure II 2.4 sont testés avec les précatalyseurs $[\text{RuCl}_2(p\text{-cymène})]_2$ et $[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$, dans les conditions standard définies précédemment (voir paragraphe 2.3). Quelques ligands ont été testés avec le complexe $[\text{Ru}(\text{met})_2\text{COD}]_2\cdot\text{HBr}$. Les meilleurs résultats, en termes de conversion, sont présentés dans le tableau II 3.1.

Tableau II 3.1. Les couples ligands/catalyseurs les plus actifs pour la réduction du CAAEt.

Entrée	Précurseur catalytique	Ligand	Conv. (%)	ee (%)
1	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>R</i>)-binap	29.9	(<i>S</i>) 86.7
2	[RuCl ₂ ((<i>R</i>)-binap)]	- ^[a]	96.0	(<i>S</i>) 85.2
3	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	SL-W005-1	95.9	(<i>S</i>) 66.3
4	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	SL-T001-1	94.8	(<i>S</i>) 84.5
5	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	SL-W009-1	89.4	(<i>S</i>) 78.8
6	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>R</i>)-solphos	52.0	(<i>S</i>) 69.8
7	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	SL-W006-1	49.3	(<i>S</i>) 84.5
8	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>S</i>)-xylyl-binap	44.3	(<i>R</i>) 71.2
9	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>R,S</i>)-josiphos	0	-
10	[RuCl ₂ ((<i>R</i>)-MeO-biphep)]	- ^[a]	46.2	(<i>S</i>) 83.5
11	[Ru(met) ₂ COD] ₂ ·HBr	(<i>R</i>)-MeO-biphep	77.9	(<i>S</i>) 88.2
12	[Ru(met) ₂ COD] ₂ ·HBr	(<i>S</i>)-Cl-MeO-biphep	86.3	(<i>R</i>) 94.6
13	[Ru(met) ₂ COD] ₂ ·HBr	(<i>R</i>)-binap	95.6	(<i>S</i>) 72.5
14	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	SL-W006-1	5.0	(<i>S</i>) 71.5
15	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>R</i>)-solphos	48.9	(<i>S</i>) 73.6

^[a] complexe préparé avant la catalyse.

En comparant les entrées 1 et 2, on remarque que l'activité d'un complexe préparé et isolé avant la catalyse est plus élevée que celle d'un complexe formé *in situ*. Bien qu'il a été montré précédemment que les complexes isolés avant la catalyse ont une meilleure activité,^[152] cette méthode ne convient pas pour un large criblage. Elle ne sera donc pas testée systématiquement. Du point de vue industriel, il est moins coûteux et donc plus intéressant d'utiliser un catalyseur formé *in situ* pour la réaction.

La majorité des bons résultats a été obtenue avec le précurseur [RuCl₂(benzène)]₂. Cela confirme les résultats préliminaires obtenus pour cette réaction. Il est le précurseur de choix pour des ligands tels que les walphos et les taniaphos qui donnent des conversions plus faibles pour les autres précurseurs au ruthénium (entrées 3, 4, 5, 7 et 14)

La combinaison du $[\text{Ru}(\text{met})_2\text{COD}]_2$ mélangé à 2 équivalents de HBr et une diphosphine (méthode Gênet)^[152] produit les catalyseurs $\text{RuBr}_2(\text{diphosphine})$ qui sont très actifs en catalyse (entrées 11 à 13). Ce complexe est très sensible à l'oxygène et il est cher donc il n'est pas très attractif pour une production à haut volume. D'autre part, ce précurseur métallique ne sera pas testé systématiquement pour tous les ligands, au vu de sa sensibilité vis-à-vis de l'eau.

Enfin, les ligands monophos, les ligands phospholanes ainsi que les ligands dérivés du josphos ont une très mauvaise activité dans ces conditions de catalyse (entrée 9).

3.1.2. Etude des complexes donnant la meilleure énantiosélectivité.

Dans le criblage réalisé sur un large éventail de combinaison ligands et précurseurs métalliques, un certain nombre ont une très bonne énantiosélectivité. Les meilleurs résultats sont listés dans le tableau II 3.2.

Tableau II 3.2. Les meilleurs couples ligands et précurseurs catalytique en termes d'énantiosélectivité pour la réduction du substrat CAAEt.

Entrée ^[a]	Précurseur catalytique	Ligand	Conv. (%)	ee (%)
1	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>S</i>)-Cy-soniphos	5.6	(<i>R</i>) 95.8
2	RuCl ₃ ·nH ₂ O	(<i>S</i>)-Cy-soniphos	5.5	(<i>R</i>) 90.9
3	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>S</i>)-Me-soniphos	6.3	(<i>R</i>) 95.7
4	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>R</i>)-C ₃ -tunephos	4.5	(<i>S</i>) 94.1
5	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>S</i>)-C ₃ -tunephos	23.4	(<i>R</i>) 92.1
6	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>S</i>)-Cl-MeO-biphep	6.1	(<i>R</i>) 94.0
7	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>S</i>)-tol-binap	24.1	(<i>R</i>) 92.9
8	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>R</i>)-binap	7.9	(<i>S</i>) 91.1
9	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>R</i>)-MeO-biphep	7.8	(<i>S</i>) 90.0
10	[RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	(<i>S</i>)-synphos	9.0	(<i>R</i>) 91.4
11	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>S</i>)-synphos	4.2	(<i>R</i>) 90.8
12	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>S</i>)-C ₁ -tunephos	28.3	(<i>R</i>) 90.1
13	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>R</i>)-MeO-biphep	4.8	(<i>S</i>) 90.0
14	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	(<i>R</i>)-C ₅ -tunephos	34.9	(<i>S</i>) 89.0

Conditions de réaction : ^[a] [CAAEt]=1.8 M dans EtOH ; S/C=2000 ; [RuCl₂(benzène)]₂ ; P(H₂)=50 bars ; 60°C ; 2 h ; L/Ru=1.05.

De manière générale, tous les ligands triaryles à chiralité axiale donnent une bonne énantiosélectivité.

D'autre part, les ligands triaryles à chiralité axiale C₂ dérivé directement du binap (binap, tol-binap, xylyl-binap) ou bien encore le ligand MeO-biphep donnent de moins bonnes sélectivités (entrées 7 à 9 et 13) que les ligands synthétisés plus récemment, pour lesquels on peut citer entre autres les ligands synphos, soniphos, Cl-MeO-biphep et C₃-tunephos (entrées 1 à 6, 10 et 11). Ces derniers sont beaucoup plus riches en électrons π donateurs ce qui explique leur bonne énantiosélectivité.^[41]

Les ligands monophos, les ligands phospholanes ainsi que les ligands dérivés du josphos ont des conversions très faibles. De ce fait, leurs excès énantiomériques ne sont pas très représentatifs.

3.1.3. Evaluation du criblage.

Les ligands triaryles de symétrie axiale C_2 , en particulier ceux de la dernière génération, engendrent les résultats les plus intéressants au niveau de la conversion, d'une part, et au niveau de la sélectivité, d'autre part, pour la réduction du substrat CAAEt (tableaux II 3.1 et II 3.2). On peut citer le ligand difluorophos, les ligands C_3 - et C_5 -tunephos ou bien encore le ligand soniphos. Comme on n'observe aucun produit de dégradation, par GC, on estime que le rendement est comparable à la conversion. Du point de vue industriel, il est important pour ce genre de réaction de minimiser toute présence de produit de dégradation qui pourrait alourdir les coûts de production. L'absence de produits de dégradation peut s'expliquer par les conditions douces employées (température peu élevée et pression basse).

3.1.4. Evolution du système catalytique.

Afin d'optimiser les meilleurs résultats que se soit en terme de conversion ou de sélectivité, plusieurs séries de catalyses ont été réalisées pour tester les effets d'additifs et de solvants. Afin de réduire le nombre de catalyses, seuls les ligands binap, tol-binap, MeO-biphep, C_3 - et C_5 -tunephos en combinaison avec le précurseur $[RuCl_2(benzène)]_2$ ont été testés.

3.1.4.1. Influence du solvant.

Le solvant de la catalyse fait partie de la seconde sphère de coordination du complexe et peut ainsi influencer de façon importante les résultats de la catalyse.^[153] Les solvants protiques, comme l'éthanol, interviennent comme donneurs de protons.^[1]

Les résultats représentatifs de l'hydrogénation du CAAEt avec le tol-binap et le C₃-tunephos en présence de différents co-solvants sont résumés dans le tableau II 3.3.

Tableau II 3.3. Sélection de résultats sur l'effet du solvant dans la réduction du substrat CAAEt.

Entrée ^[a]	Ligand	Solvant	Conv. (%)	ee (%)
1	(S)-tol-binap	EtOH	28.2	(R) 78.3
2	(S)-tol-binap	EtOH / CH ₂ Cl ₂ 1:1	30.4	(R) 93.4
3	(S)-tol-binap	EtOH / THF 1:1	22.6	(R) 88.0
4	(S)-tol-binap	EtOH / AcOEt 1:1	29.9	(R) 87.4
5	(S)-tol-binap	EtOH / acétone 1:1	28.8	(R) 78.9
6	(S)-tol-binap	EtOH / CH ₂ Cl ₂ 1:20	16.9	(R) 86.3
7	(S)-tol-binap	EtOH / CH ₂ Cl ₂ 20:1	25.1	(R) 81.9
8	(S)-C ₃ -tunephos	EtOH	23.4	(R) 92.1
9	(S)-C ₃ -tunephos	EtOH / CH ₂ Cl ₂ 1:1	32	(R) 97.1
10	(S)-C ₃ -tunephos	EtOH / THF 1:1	5.2	(R) 54.4
11	(S)-C ₃ -tunephos	EtOH / AcOEt 1:1	19.6	(R) 81.5
12	(S)-C ₃ -tunephos	EtOH / acétone 1:1	23.2	(R) 70.8
13	(S)-C ₃ -tunephos	EtOH / CH ₂ Cl ₂ 20:1	14.6	(R) 90.2

Conditions de réaction : ^[a] [CAAEt]=1.8 M ; S/C=2000 ; [RuCl₂(benzène)]₂ ; P(H₂)=50 bars ; 60°C ; 2 h ; L/M=1.05.

De tous les mélanges de solvant testés, aucun n'améliore de manière importante l'activité du catalyseur. La sélectivité augmente lorsque l'on a un mélange à volume équivalent d'éthanol et de dichlorométhane. On observe une sélectivité de plus de 93% pour le tol-binap et de 97% pour C₃-tunephos (voir entrées 2 et 9 vs. entrées 1 et 8). Plusieurs exemples dans la littérature suggèrent que le mélange EtOH et CH₂Cl₂ a un effet bénéfique pour la réduction énantiosélective du substrat CAAEt.^[127,147,154]

Pour le ligand (*S*)-tol-binap, l'ajout d'un co-solvant a pour effet d'augmenter la sélectivité (entrées 2 à 6). En revanche, pour le ligand (*S*)-C₃-tunephos, tous les co-solvants autres que le CH₂Cl₂ additionnés à la catalyse diminuent la sélectivité (entrées 10 à 13).

3.1.4.2. Influence des additifs.

Les effets des additifs sur la conversion et l'énantiosélectivité dans la réaction d'hydrogénation du CAAEt sont testés avec le ligand binap et le [RuCl₂(benzène)]₂. Un large éventail d'acides et de bases minérales ou organiques a été testé. Des acides Lewis ont également été testés. Pour ces tests, les conditions sont [CAAEt]=1.8 M dans un mélange de solvant EtOH / CH₂Cl₂ : 20/1, L/M=1.05, P(H₂)=50 bars, 60°C, 2 h. Les résultats obtenus avec le ligand binap sont décrits dans le tableau II 3.4.

Tableau II 3.4. Sélection de résultats sur l'ajout d'additifs pour la réduction énantiosélective du substrat CAAEt avec binap comme ligand et $[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$ comme précurseur catalytique.

Entrée	Additif	Conv. (%)	ee (%)
1	-	32.9	86.9
2	HCl 2M 33 éq./Ru	70.6	62.1
3	HBr conc. 73 éq./Ru	64.2	49.2
4	K_2HPO_4 10 éq./Ru	52.5	91.1
5	$\text{B}(\text{OEt})_3$ 10 éq./Ru	51.7	87.3
6	NaOAc 10 éq./Ru	51.3	90.9
7	KOAc 10 éq./Ru	48.7	89.3
8	Et_3N 20 éq./Ru	45.6	92.0
9	NaTf 10 éq./Ru	44.3	87.1
10	EN ^[a] 10 éq./Ru	44.3	93.1
11	K_2SO_4 10 éq./Ru	39.1	88.8
12	KBF_4 10 éq./Ru	29.3	92.2
13	NaCl 10 éq./Ru	26.0	89.1
14	TBACl 3 éq./Ru	25.9	88.5
15	$\text{Al}(\text{acac})_3$ 10 éq./Ru	23.1	89.0

^[a] EN= Ethylène diamine.

Ces additifs ont aussi été testés sur les ligands MeO-biphep, C_1 - et C_3 -tunephos. En comparaison avec les résultats obtenus pour le ligand binap, les mêmes tendances sont observées pour ces trois ligands.

D'une manière générale, l'ajout d'un additif à la catalyse augmente l'activité du complexe (voir entrées 2 à 11).

L'ajout d'un acide à la catalyse permet d'augmenter l'activité du complexe, ce qui est le cas lorsque l'on ajoute de l'acide chlorhydrique ou l'acide bromhydrique (entrées 2 et 3). Cependant, une érosion significative de la sélectivité est observée avec une diminution de plus

de 20% de l'excès énantiomérique pour le premier et 40% pour le deuxième. De plus, l'analyse par GC montre la présence importante de produits de dégradation. Elle est estimée supérieure à 40%. L'acide trifluoroacétique a aussi été testé avec le ligand tol-binap et le complexe $[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$ mais il ne donne pas de bons résultats (76.4% d'excès énantiomérique pour 31.8% de conversion à comparer avec le résultat sans additif qui est de 80.8% d'excès énantiomérique et 28.8% de conversion).

Lors de l'ajout de base faible (entrées 4, 6, 7, 8, 10 et 11), qu'elle soit de nature minérale ou organique, on observe une augmentation de la sélectivité. Les augmentations les plus significatives de conversion ont été observées lors de l'ajout de phosphate ou d'acétate de sodium et de potassium. Pour ce qui est des bases organiques comme la triéthylamine (entrée 8) et l'éthylène diamine (EN, entrée 10), l'augmentation de conversion est plus modeste avec une très bonne sélectivité de 92% ee pour la triéthylamine et de 93% ee pour l'éthylène diamine.

L'ajout d'un sel de bore (entrée 5) a un effet positif sur la conversion mais donne la même sélectivité que la réaction de référence.

L'ajout d'un acide de Lewis (entrée 15) améliore la sélectivité du système. En revanche, la conversion diminue à 23%.

3.2. Expérience sur le substrat l'ester d'éthyle de la carnitone.

Il n'existe que très peu d'exemples de la réduction de l'ester d'éthyle de la carnitone dans la littérature.^[139] Basée sur les résultats obtenus pour la réduction du CAAEt et afin de réduire le nombre de catalyses, une sélection de couples ligands et précurseurs de ruthénium a été testée dans le cadre de la réduction de l'ester d'éthyle de la carnitone.

3.2.1. Méthode pour l'analyse de l'ester d'éthyle de la carnitine.

Pour le substrat ester d'éthyle de la carnitine, la conversion et l'excès énantiomérique ne peuvent pas être déterminés par GC, parce-que le substrat et les produits d'arrivée sont des sels. De même, comme aucun chromophore n'est présent, l'analyse ne peut pas être faite par HPLC dans notre laboratoire, car cette méthode utilise un détecteur UV-Vis.

Les analyses ont été réalisées par le Dr. Golo Heckmann (Lonza AG). La conversion a été déterminée par une méthode infrarouge (IR) semi-quantitative. Cette méthode est basée sur l'absorption des bandes d'élongation CO du substrat et de la bande d'élongation CO des produits aux alentours de 1700 cm^{-1} . La disparition de la bande CO du substrat qui pendant la catalyse est réduite en alcool permet de quantifier la conversion (la bande d'élongation de l'alcool absorbe au alentour de 3200 cm^{-1}). La disparition complète de la bande CO réduite signifie que la conversion de la catalyse est totale. Une courbe de calibration est nécessaire pour arriver à déterminer la conversion de façon plus précise.

L'excès énantiomérique est déterminé par résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'aide d'un complexe d'euporium (III).^[155] Ce complexe d'euporium (III) (avec un ligand dérivé du camphre) forme des complexes diastéomériques avec des amines et des alcools chiraux. Pour deux complexes diastéréomériques, on observe une légère différence entre les signaux correspondant aux amines ou aux alcools chiraux en RMN (^1H). Les signaux pour les deux diastéréomères étant légèrement différents, il est alors possible de déterminer avec moins de 1% d'erreur l'excès énantiomérique.

3.2.2. Résultats du criblage.

Due à la quantité limitée de substrat disponible, seulement 80 expériences ont été réalisées avec l'ester d'éthyle de la carnitone. La réaction a été réalisée avec un rapport substrat / catalyseur plus petit (100/1). Les conditions de réaction sont : [ester d'éthyle de la carnitone]= 0.7 M dans l'éthanol, $[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$, L/M= 1.05, S/C= 100, $p\text{H}_2=50$ bars, 2 h. Les deux températures (60 et 100°C) ont été testées avec 40 ligands. Les résultats les plus significatifs sont présentés dans le tableau II 3.5.

Tableau II 3.5. Meilleurs résultats obtenus dans l'hydrogénation de l'ester d'éthyle de la carnitone.

Entrée	Ligand	T (°C)	ee (%)
1	(S)-difluorophos	100	(R) 95.4
2	(S)-Cy-soniphos	100	(R) 93.8
3	(S)-synphos	100	(R) 92.2
4	(S)-Me-soniphos	100	(R) 91
5	(S)-Cl-MeO-biphep	100	(R) 90
6	(R)-MeO-biphep	100	(S) 89.4
7	(R)-solphos	60	(S) 89.1
8	(R)-solphos	100	(S) 88.6
9	(S)-tol-binap	100	(R) 84.6
10	(R)-binap	100	(S) 79.2
11	(R)-Me-bophoz	100	(S) 56.2
12	(S)-3,5-xylyl-binap	100	(R) 56.2

Remarque : Toutes les expériences donnent une conversion totale.

De manière générale comme pour le substrat CAAEt, l'ester d'éthyle de la carnitone présente une meilleure réactivité à haute température. Seul le ligand (*R*)-solphos (entrée 7) donne une conversion totale à 60°C.

Comme avec le substrat CAAEt, les meilleures énantiosélectivités sont obtenues avec des ligands diphosphines triaryles à chiralité axiale C₂, le meilleur résultat est obtenu pour le ligand difluorophos avec un excès énantiomérique de 95% (entrée 1). Les ligands Me- et Cy-soniphos et synphos révèlent une très bonne sélectivité avec des excès énantiomériques supérieurs à 90% (entrées 2 à 4). Globalement, la tendance est la même que pour l'hydrogénation du substrat CAAEt à 100°C.

Les ligands de type binap montrent des résultats assez modestes au niveau de l'énantiosélectivité avec un maximum de 84.6% pour le tol-binap (entrée 9).

Aucune autre optimisation n'a été réalisée pour la réduction du substrat ester d'éthyle de la carnitone. Basé sur le criblage initial résumé dans le tableau II 3.5, le meilleur résultat obtenu est supérieur à 95% d'excès énantiomérique. L'effet du ratio substrat/catalyseur reste encore à être déterminer.

4. Conclusion.

Un criblage a été réalisé pour l'hydrogénation asymétrique du CAAEt et de l'ester d'éthyle de la carnitone, en se concentrant sur les ligands de type diphosphine triaryle à chiralité axiale C₂. Pour le substrat CAAEt, un large éventail de précurseurs métalliques, ligands, solvants et additifs ont été évalués à 60°C et 50 bars et pour un ratio substrat/catalyseur de 2000/1. Dans ces conditions, le Cy-soniphos donne plus de 95% ee,

mais avec une conversion modeste (< 10%). Dans des travaux futurs, il serait intéressant de tester les ligands donnant les meilleurs excès énantiomériques avec les additifs et les solvants essayés. Un bon compromis devrait être trouvé pour permettre d'avoir une bonne conversion et un excès énantiomérique supérieur à 95%.

Concernant l'hydrogénation catalytique au ruthénium de l'ester d'éthyl de la carnitone, une sélectivité supérieure à 95% a été obtenue à 100°C avec une conversion totale (avec S/C = 100). Il reste cependant à compléter ces premiers résultats afin d'étudier la possibilité de cette voie dans l'optique d'une application industrielle pour la production de la carnitine optiquement pure.

Chapitre III :Deuxième sphère de coordination : Création de métalloenzymes artificielles basées sur la technologie biotine-(strept)avidine pour la réaction d'alkylation allylique asymétrique.

1. Introduction.

Ce chapitre décrit l'utilisation de la technologie biotine-(strept)avidine pour la création des catalyseurs hybrides et leur application avec la réaction d'alkylation allylique asymétrique.^[93,156,157]

La formation de liaison carbone-carbone par la catalyse au palladium joue un rôle important dans la construction de molécules organiques complexes. Comme ce métal précieux polyvalent est absent dans les enzymes naturelles, la nature utilise un certain nombre de procédés de substitution pour la formation de liaison carbone-carbone afin de réaliser la construction de molécules naturelles complexes.^[158] Parmi les réactions de catalyse au palladium, l'alkylation allylique asymétrique a fait l'objet de nombreux travaux.^[93,159,99,160,161,95,162]

L'alkylation allylique asymétrique s'apparente à une réaction enzymatique dans laquelle le substrat ne se lie pas de manière covalente avec le site actif de l'enzyme pour donner une bonne énantiosélectivité.

Ces dernières années, l'intérêt pour les systèmes catalytiques hybrides, de type enzymes artificielles énantiosélectives s'est fortement accru. D'une manière générale, un

précurseur métallique responsable de l'activité catalytique est accroché dans une biomolécule afin de créer un environnement chiral autour du métal.^[49,69,163-166,63,167-169] Les efforts dans le domaine de la création des métalloenzymes artificielles ont permis le développement de nombreuses transformations de la catalyse asymétrique, telles que l'hydrolyse d'ester,^[170] la dihydroxylation,^[171] l'époxydation,^[172,173] la sulfoxydation,^[66,70-72,174] l'hydrogénation,^[73-79,175-178] le transfert hydrogénéant,^[80,81] les réactions de Diels-Alder.^[179-183] et les additions de Michael.^[184] De plus, les travaux conduits dans notre groupe ont prouvé la grande versalité des catalyseurs hybrides basés sur la technologie biotine-(strept)avidine et la possibilité d'une rapide optimisation chimique et génétique. Le but de notre étude est d'appliquer cette technologie à la réaction d'alkylation allylique asymétrique, une réaction complètement nouvelle dans le monde des enzymes artificielles.

Pour cette transformation, l'énantiodiscrimination du substrat se fait via l'attaque externe d'un nucléophile mou sur le système allylique du complexe (figure III 1.1).^[93,95]

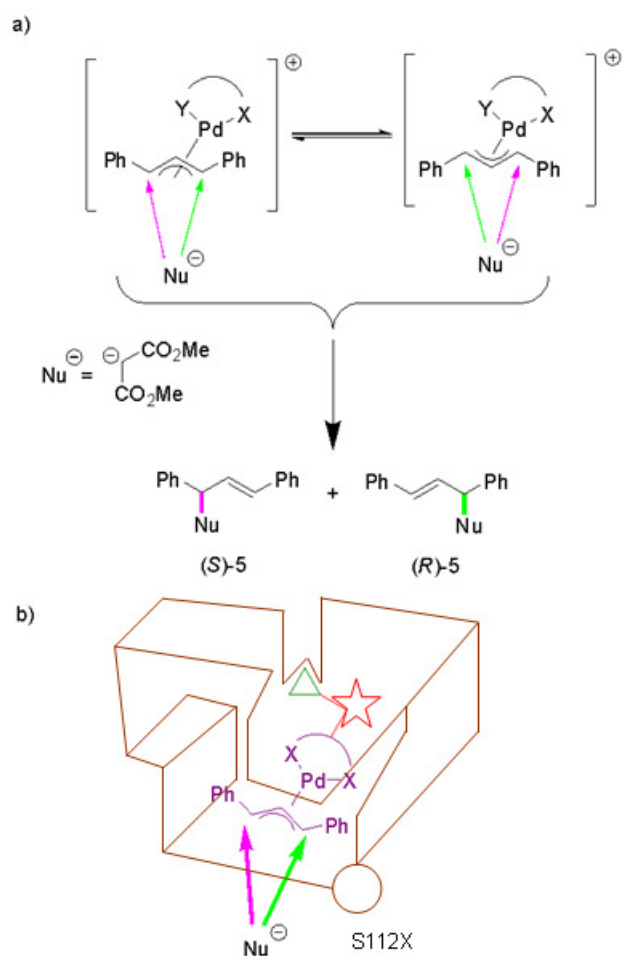


Figure III 1.1. Mécanisme postulé pour l'énantiodiscrimination de l'alkylation allylique asymétrique, dans une catalyse en phase homogène a) ; dans une métalloenzyme artificielle b). La protéine hôte ((strept)avidine, brun) a une grande affinité pour la biotine (triangle vert) ; l'introduction d'un acide aminé comme espaceur (étoile rouge), combiné avec un ligand chélatant (violet) permet une optimisation chimique de l'activité et de la sélectivité. Chaque acide aminé place l'entité palladium dans un environnement chiral distinct. La mutation dirigée en position S112X permet une fine optimisation du système.

2. Création des métalloenzymes artificielles pour l'alkylation allylique asymétrique.

2.1. Le système catalytique.

2.1.1. Considérations générales.

Afin de concevoir un catalyseur hybride pour l'alkylation allylique asymétrique basé sur la technologie biotine-(strept)avidine, il est nécessaire de définir le système catalytique. Celui-ci doit être compatible avec la présence d'eau et de protéine, qui requiert la mise au point des conditions de réactions. La transformation du substrat en produit d'alkylation par les catalyseurs hybrides est décrite dans la figure III 2.1.

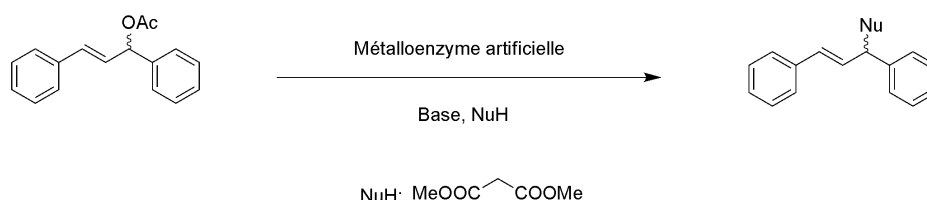


Figure III 2.1. Représentation générale de la réaction de transformation du substrat par l'alkylation allylique asymétrique basé sur le système biotine-(strept)avidine.

L'acétate de 1,3-diphényl-2-propényle est choisi comme substrat modèle pour étudier cette réaction et le nucléophile utilisé est le malonate de diméthyle.

La partie organométallique est composée d'un ligand de type diphosphine et du métal (palladium), introduit à partir de précurseur métallique. Les deux précurseurs métalliques

utilisés au cours de ce travail sont : $[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$ et du $[\text{PdCl}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})]_2$. Les complexes sont préparés *in situ*.

Du fait de l'utilisation d'une protéine, la catalyse est réalisée en présence de 10% de solvant organique (v/v).

De plus, l'utilisation d'une base est nécessaire pour déprotonner le malonate de diméthyle ($\text{pK}_a = 12.9$). Enfin, un agent de transfert de phase a été utilisé afin de permettre une meilleure solubilité du substrat.

2.1.2. Les types de ligands pour l'alkylation allylique asymétrique.

De nombreux types de ligands sont utilisés, en association avec le palladium, pour l'alkylation allylique asymétrique. Différents chélates se sont révélés efficaces, comme les diphosphines, des composés diamines ou bien encore les ligands P-N.^[93]

2.1.2.1. Structures des ligands biotinylés utilisés avec les alkylases hybrides.

Pour ce projet, 5 types de ligands disponibles au laboratoire et susceptibles de fonctionner dans une réaction d'alkylation allylique asymétrique ont été testés comme chélates du palladium. Il s'agit des ligands de types bipyridine, terpyridine, diphosphines de type biaryles alkyles et triaryles. La plupart de ces ligands biotinylés ont été synthétisés pour d'autres réactions développées au sein du laboratoire comme l'hydrogénation ou le transfert hydrogénant par le système de catalyseurs hybrides.^[77,80] Les différents ligands utilisés pour cette réaction sont présentés dans la figure III 2.2.

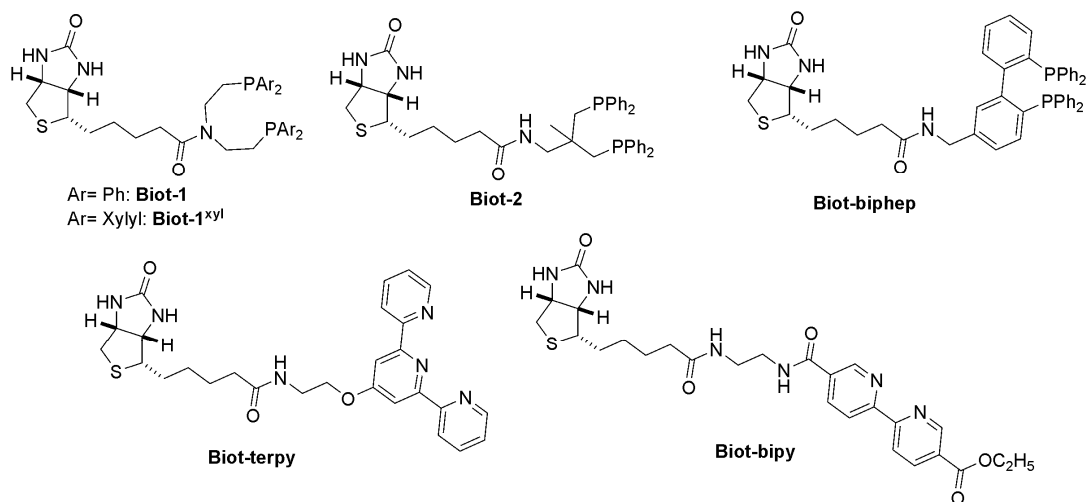


Schéma III 2.2. Structure des ligands biotinylés utilisés pour la réaction d'alkylation allylique asymétrique.

2.1.2.2. Synthèse du ligand biotinylé de type terpyridine (**Biot-terpy**).

Par le passé, notre groupe a développé la synthèse de nombreuses classes de ligands, comme les ligands de types phosphines, diamines, salen, bipyridine. Dans notre cas d'étude, nous proposons la synthèse d'un nouveau type de ligand, il s'agit du ligand terpyridine. Son abréviation est **Biot-terpy** et sa synthèse est présentée dans la figure III 2.3.

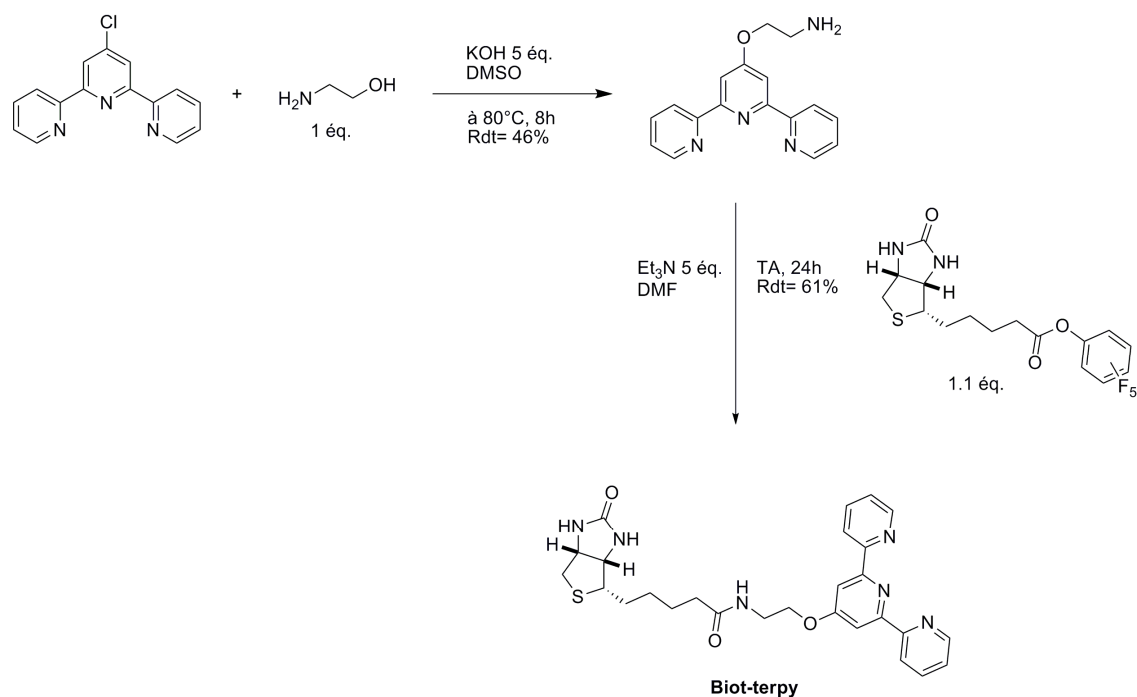


Figure III 2.3. Synthèse du ligand **Biot-terpy**.

Pour cette synthèse, le 4'-chloro-terpyridine est le réactif de choix. Le groupement chlore permet d'envisager plusieurs variations de structures en couplant différents espaceurs afin de pouvoir changer la position du métal à l'intérieur du site actif de la protéine. L'éthanolamine a été pris comme premier motif espaceur.

Dans ce cas, l'étape limitante de la synthèse est la substitution du chlore par le groupement amine de l'éthanolamine.^[185]

Bien que le rendement global de la synthèse soit modeste (28% sur 2 étapes) le ligand **Biot-terpy** est obtenu suffisamment pur après colonne chromatographique sur silice pour être testé en catalyse.

La synthèse des autres ligands est décrite dans des articles publiés précédemment.^[77,78,175,186]

2.1.2.3. Evaluation des différents ligands dans l'alkylation allylique asymétrique.

Cette expérience a pour but de trouver la ou les structures des ligands donnant la meilleure activité catalytique.

Les cinq types de ligands, décrits dans la figure III 2.2, peuvent être testés en catalyse en présence de streptavidine et avidine pour évaluer leur activité en alkylation allylique asymétrique. Les conditions de réactions sont décrites dans la figure III 2.4.

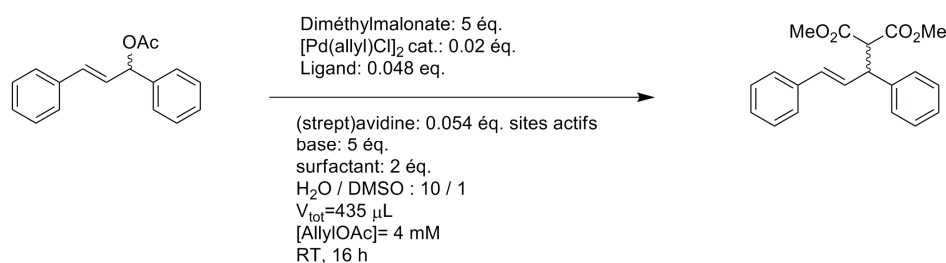


Figure III 2.4. Conditions opératoires utilisées pour l'alkylation allylique asymétrique par les métalloenzymes artificielles.

Un standard de conditions est défini après des tests, nécessaires à la mise en place d'un protocole pour la catalyse. Le complexe [PdCl(η^3 -allyl)]₂, la streptavidine et l'avidine de type sauvage (0.054 éq. en sites actifs) avec un rapport de 0.02 éq. du palladium avec le substrat, 5 éq. de base et 2 éq. de surfactant par rapport au substrat ont été utilisés pour ces catalyses.

Une comparaison des activités catalytiques et des énantiosélectivités obtenues avec les différents ligands dans ces conditions est présentée dans le tableau III 2.1.

Tableau III 2.1. Identification du meilleur ligand pour l'alkylation allylique asymétrique.

Entrée	Ligand	Protéine	ee (%)	Conv. (%) ^[a]
1	Biot-1	WT Sav	29	21
2	Biot-2	WT Sav	0	0
3	Biot-1^{xyI}	WT Sav	15	23
4	Biot-biphep	WT Sav	0	0
5	Biot-bipy²	WT Sav	0	0
6	Biot-terpy	WT Sav	23	4
7	Biot-1	WT Avi	10	50
8	Biot-2	WT Avi	0	0
9	Biot-1^{xyI}	WT Avi	6	17
10	Biot-biphep	WT Avi	0	0
11	Biot-bipy²	WT Avi	0	0
12	Biot-terpy	WT Avi	0	0

^[a]Conv.= conversion. Aucun produit de départ n'est détecté, nous avons identifié seulement du substrat hydrolysé et du produit alkylé.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec les ligands **Biot-1** et **Biot-1^{xyI}** (entrée 1, 3, 7, 9). Il semble que ce soit le ligand diphosphine formant un cycle à 8 chaînons avec le palladium qui donne les meilleurs résultats non seulement au niveau de la conversion mais aussi de l'excès énantiomérique. Ces résultats sont assez encourageants dans l'optique d'une optimisation chimique et génétique.

2.1.3. Influence des agents de transfert de phase sur la catalyse.

L'utilisation d'un surfactant dans une catalyse en solution aqueuse est une alternative souvent utilisée pour favoriser la solubilisation du substrat.^[187] Dans cette optique, six

surfactants ont été testés pour notre système, dont un anionique et cinq cationiques. Ils sont présentés dans la figure III 2.5.

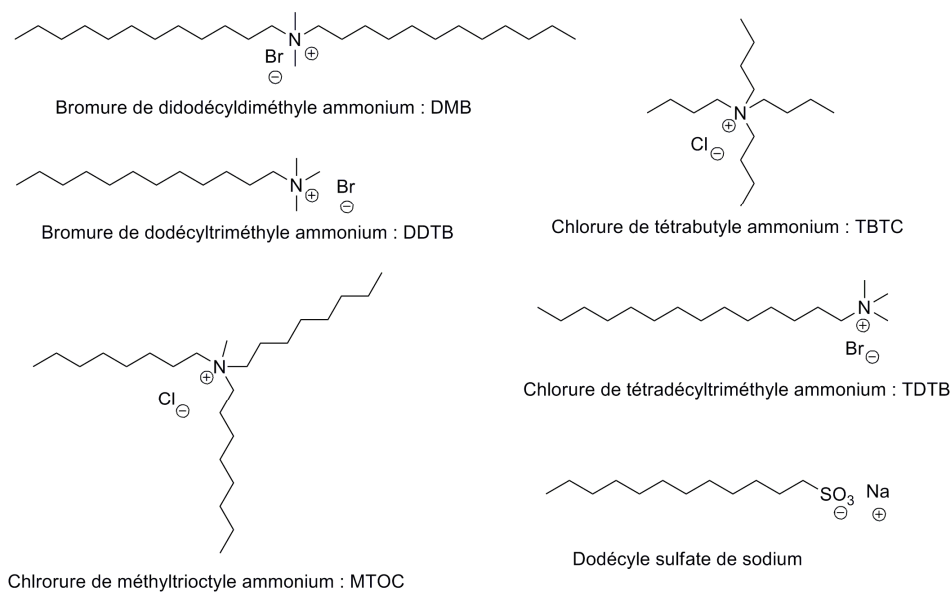


Figure III 2.5. Représentation des différents surfactants testés.

Ces différents surfactants ont été testés en présence de streptavidine de type sauvage et du ligand **Biot-1**. Pour cette expérience, 2 équivalents de surfactant par rapport au substrat ont été utilisés. Les résultats sont présentés dans le tableau III 2.2.

Tableau III 2.2. Identification du meilleur surfactant pour l'alkylation allylique asymétrique.

Entrée ^[a]	Surfactant	ee (%)	Conv. (%) ^[b]
1	-	14	<5 ^[c]
2	SDS	-	-
3	DMB	29	21
4	TDTB	36	<5
5	MTOC	25	42
6	DDTB	42	<5
7	TBTC	19	<5

^[a]Conditions expérimentales : le précurseur catalytique est préparé in situ dans du DMSO [PdCl(η^3 -allyl)]₂ 0.02 éq., **Biot-1** 0.048 éq.. Il est mélangé à une solution aqueuse contenant : de la protéine 0.054 éq. en sites actifs, K₂CO₃ 5 éq., surfactant 2 éq., H₂C(CO₂Me) 5 éq. et [substrat]= 4 mM (concentration finale), 1 éq. Le volume final est de 435 μ L, DMSO : H₂O = 1 : 10. La réaction est agitée pendant 16 h à température ambiante. ^[b]Conv.= conversion. Aucun produit de départ n'est détecté, nous avons identifié seulement le produit d'hydrolyse et le produit alkylé. ^[c]Pas de surfactant.

L'utilisation d'un surfactant anionique (entrée 2) ne donne pas de résultat. En effet, pour cette expérience, seul du produit d'hydrolyse a été identifié lors de l'analyse. De plus, en raison de la présence de surfactant, la solution forme un gel qui rend l'extraction difficile. L'utilisation de ce type de surfactant anionique a été abandonnée.

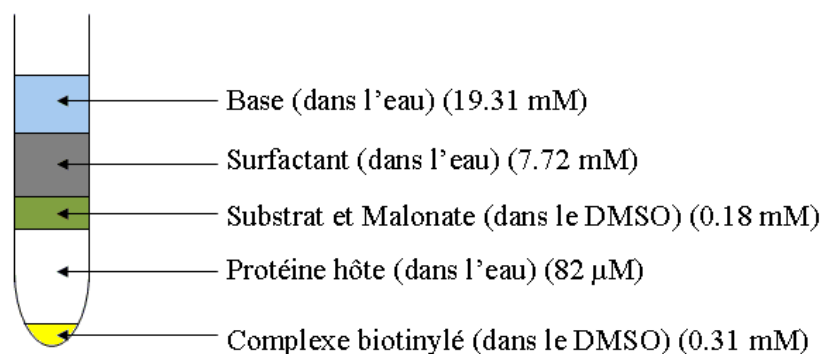
Concernent les surfactants cationiques avec un groupement ammonium, une amélioration de la conversion en présence de surfactant a été constatée par rapport à la même expérience sans surfactant (comparer les entrées 1 et 4 ; 1 et 6 du tableau II 2.2). L'énantiosélectivité est légèrement différente suivant le surfactant utilisé. Nous supposons que la présence d'un surfactant dans la catalyse change la conformation de la protéine ce qui expliquerait cette différence. Deux catalyses (entrée 3 et 5) ont donné un meilleur excès

énantiomérique. Pour la suite des expériences, le DMB a été choisi comme surfactant car il a un effet positif sur l'activité de la catalyse et sur l'énantiosélectivité.

2.1.5. Mise en œuvre de la catalyse.

La réaction d'alkylation allylique asymétrique étant sensible à l'oxygène, toutes les étapes de la catalyse ont été faites sous atmosphère inerte dans une boîte à gants. La pesée et le traitement de la catalyse ont été faits à l'extérieur de celle-ci.

Les solutions d'eau milliQ et de DMSO utilisées ont été préalablement désoxygénées par un flux d'azote pendant 2 h. La concentration finale en protéine tétramérique est de 82 μM lors de la catalyse. Le complexe est préparé *in situ* dans la boîte à gants. Le ligand est dissout dans du DMSO à une concentration de 8 mM et le précurseur au palladium est également dissout dans du DMSO à une concentration de 6.8 mM. A 20 μL de la solution de complexe ont été ajoutés 275 μL de la solution de protéine. Une solution stock de substrat et de malonate de diméthyle est également préparée dans du DMSO à une concentration de 4 mM pour le substrat. Le rapport entre le malonate de diméthyle et le substrat est de 5 équivalents. 20 μL de cette solution ont été ajoutés à la catalyse. Les solutions de surfactant (0.056 M) et de base (0.14 M) sont préparées dans l'eau. Nous ajoutons 60 μL de chacune d'elles à la catalyse pour avoir 2 équivalents de surfactant et 5 équivalents de base. Pour un volume final de 435 μL , le milieu de la catalyse contient 9.1% de DMSO (v/v). Lors de la catalyse, les réactifs sont ajoutés en séquence selon la figure III 2.6.



Vial de catalyse

Figure III 2.6. Séquence d'ajout des réactifs dans le vial de catalyse.

Une fois préparés, les vials sont fermés et laissés sous agitation dans la boîte à gants pendant 16 h à température ambiante.

En fin de réaction, les vials sont retirés de la boîte à gants. Le produit d'alkylation, le substrat et le produit d'hydrolyse, peu solubles dans l'eau, sont facilement extraits à l'éther (2 x 500 μ L). L'analyse des résultats est effectuée par HPLC chirale. Afin d'éviter le problème de présence de sels ou de métaux, les extraits étherés sont préalablement filtrés sur une couche de silice avant l'injection avec l'éther comme éluant. De manière à s'assurer qu'il n'y a pas d'enrichissement lors de cette purification, le substrat, les énantiomères et le produit sont élués à l'éther ($R_f=0.95$). Différents tests d'injection ne montrent pas d'enrichissement en produit ou en substrat lors de cette étape de purification.

2.2 Evolution chimio-génétique du système des métalloenzymes artificielles.

Les conditions de réaction imposées par le système catalytique étant définies, les métalloenzymes artificielles ont été systématiquement testées afin de cerner le potentiel de ce

nouveau type de catalyseur (énantiosélectivité, activité). Une première optimisation chimique et génétique des métalloenzymes artificielles est réalisée. La diversité chimique est apportée par des variations de structure du complexe organométallique et la diversité génétique est apportée par les différents mutants de la (strept)avidine. Toutes ces protéines sont produites au laboratoire par l'équipe de biochimistes du groupe, notamment par le Dr. Creus, Mme Sardo et Dr. Ivanova.

2.2.1. Diversité chimique.

Comme les précédents travaux l'ont montré pour les hydrogénases artificielles, l'introduction d'un espaceur acide aminé entre la biotine et le motif diphosphine permet d'optimiser les performances des métalloenzymes artificielles. Chaque modification apportée place le métal dans un environnement chiral distinct.

A partir des résultats obtenus lors du premier test catalytique, l'introduction dans notre système d'une diversité supplémentaire au niveau chimique peut être réalisée par ajout d'un espaceur achiral sur le ligand **Biot-1**.^[76] De plus, l'introduction d'un espaceur chiral peut être aussi intéressante.^[79] Les ligands de ce type sont présentés dans la figure III 2.7.

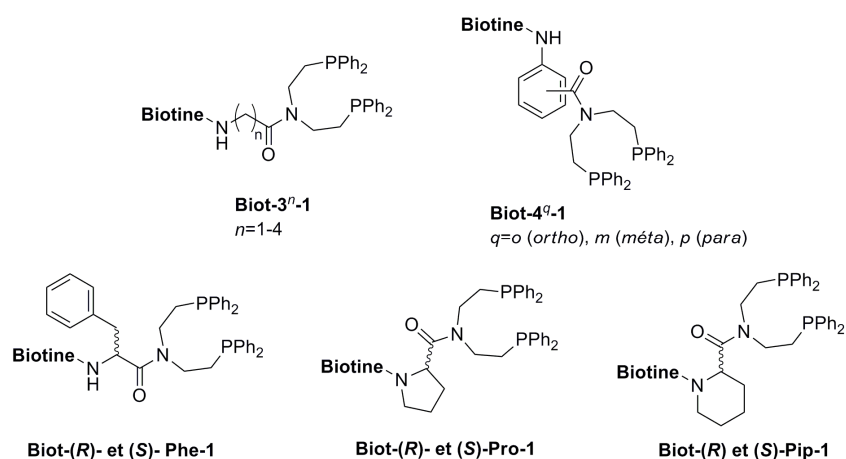


Schéma III 2.7. Diversité chimique des ligands biotinylés obtenus par l'introduction d'un résidu acide aminé entre la biotine et la diphosphine (**Biot-espaceur-1**).

La première classe de ligands, abrégée **Biot-3ⁿ-1**, contient un espaceur achiral de type aminoacide aliphatique avec une chaîne carbonée allant de 1 à 4 carbones (n= 1 à 4). Pour la deuxième classe de ligands, abrégée **Biot-4^q-1**, un espaceur achiral aminoacide aromatique est introduit, permettant la variation du point d'ancrage du ligand diphosphine sur le noyau aromatique (*ortho*, *méta* ou *para* par rapport à la biotine) et donc la variation de la position du métal dans la protéine. Pour la dernière classe de ligands, un espaceur aminoacide énantiopur a été introduit. Pour l'hydrogénation, ce type de ligands a montré une bonne activité et des résultats intéressants du point de vue de la sélectivité.^[79,178] Les trois espaceurs sélectionnés sont la phénylalanine, la proline et l'acide pipécolinique.

2.2.2. Diversité génétique.

La modification peut aussi être apportée au système de catalyseurs hybrides par mutation de la streptavidine.

L'intérêt des catalyseurs hybrides réside dans l'immense possibilité de mutation de la protéine hôte. De telles variations, notamment au niveau de la boucle 7-8 de la streptavidine, que l'on suppose assez proche du métal, permettent de varier la seconde sphère de coordination chirale autour du palladium.

La position S112 a été mutée par la totalité des acides aminés naturels sauf la mutation par la proline. En effet, celle-ci donne de mauvais rendements de production de la protéine et est difficile à purifier. Les deux protéines sauvages (Sav WT et Avi WT) ont aussi été testées. De plus, deux protéines doublement mutées ont été testées. Il s'agit des protéines suivantes S112G-V47G et S112G-N118T (la première lettre désigne la nature de l'acide aminé muté ; le chiffre, la position de celui-ci dans la séquence et la deuxième lettre, l'acide aminé par lequel il a été remplacé). Trois des quatre mutations ont pour but de remplacer un acide aminé par la glycine. En effet, cet acide aminé est le plus petit acide aminé naturel, achiral, qui par l'absence de chaîne latérale possède la propriété de laisser des degrés de liberté plus importants pour les angles ψ et Φ d'une liaison peptidique. Le fait de remplacer un acide aminé par une glycine dans la séquence d'une protéine se traduit par une flexibilité accrue de la structure au point de mutation. Les positions mutées dans la streptavidine sont représentées dans la figure III 2.8.

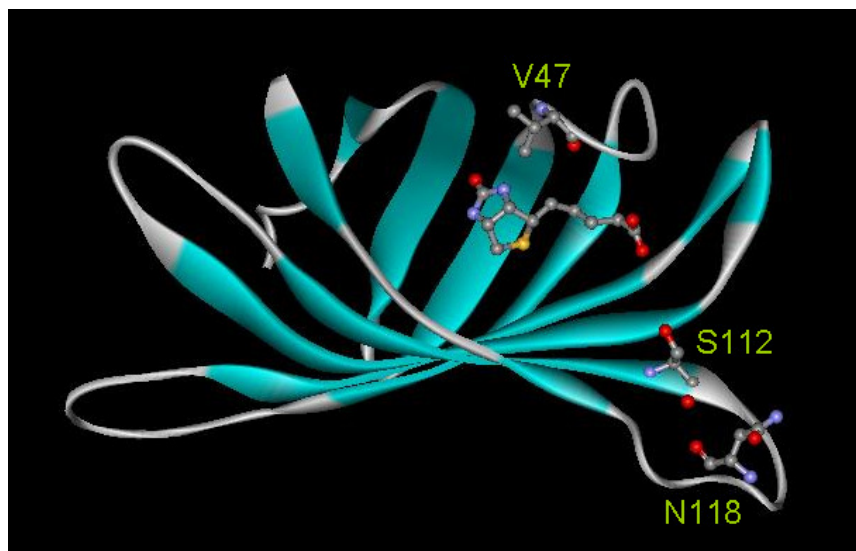


Figure III 2.8. Position des mutations dans la streptavidine (Sav WT). Un seul monomère contenant la biotine est représenté.

2.2.3. Large criblage de l'alkylase hybride *via* la diversité chimio-génétique.

Les quatorze complexes biotinylés sont combinés avec les vingt et une isoformes de la streptavidine (S112X où X=acides aminés naturels exceptés la proline, S112G-N118T, S112G-V47G, Sav WT) ou avec l'avidine (Avi WT), puis criblés en alkylation allylique asymétrique en présence du acétate de 1,3-diphényl-2-propényle comme substrat, du malonate de diméthyle, du DMB comme surfactant, de K_2CO_3 comme base et du $[PdCl(\eta^3\text{-allyl})]_2$ comme précurseur du catalyseur.

Pour simplifier la lecture des résultats, ceux-ci sont représentés à l'aide des « empreintes » des carrés de couleurs.^[76] Chaque carré correspond à une combinaison précise de la conversion et de l'énantiosélectivité. La nuance de la couleur caractérise la conversion (foncée pour les bonnes conversions ; claire pour les mauvaises conversions), la couleur varie du rose pour l'énantiomère (*S*) au vert pour l'énantiomère (*R*) en passant par le gris pour le racémate (figure III 2.9).

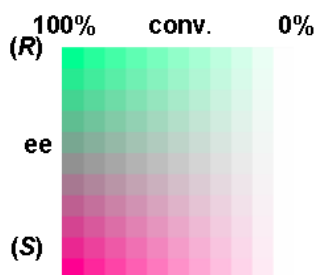


Figure III 2.9. Représentation de la conversion et de l'excès énantiomérique en mode « empreintes ».

Les catalyseurs hybrides issus de la combinaison des 14 complexes et 22 protéines sont testés en catalyse et représentés sous forme d'empreinte de façon à identifier les tendances (Figure III 2.10).

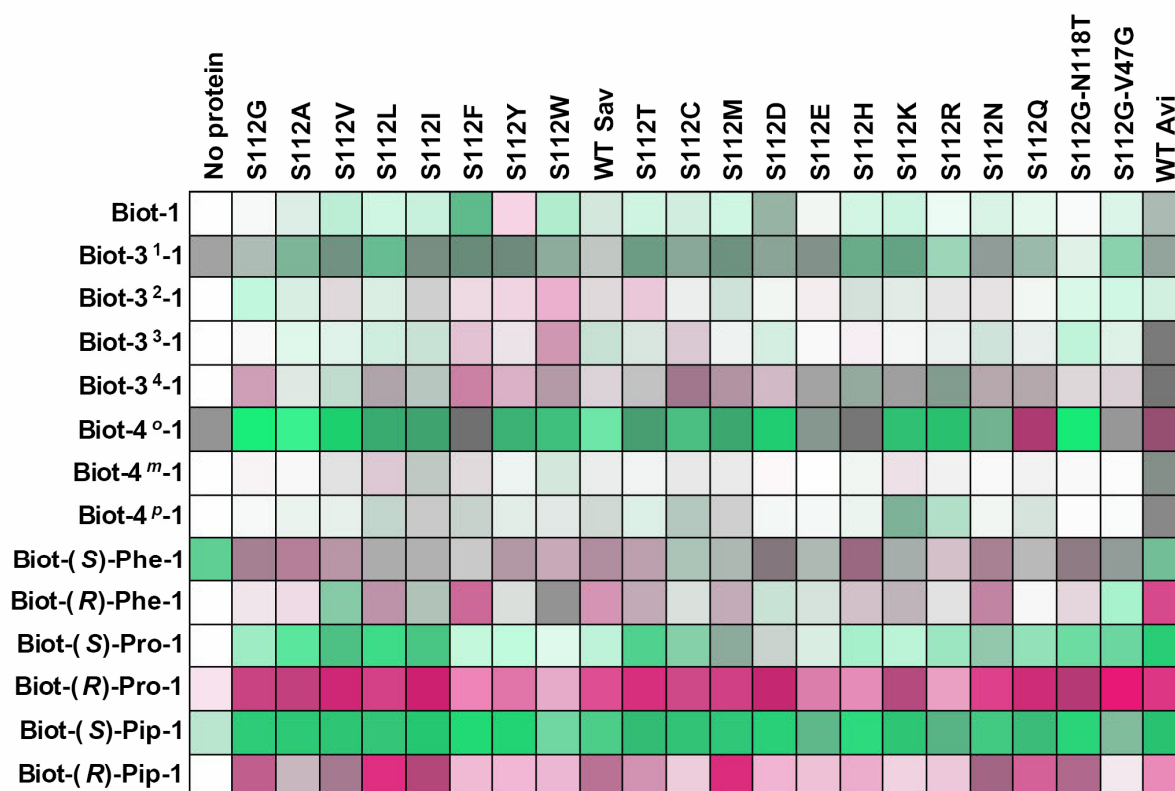


Figure III 2.10. Empreintes des résultats obtenus pour l'optimisation chimio-génétique de l'alkylation allylique asymétrique.

Sur la base de ces résultats plusieurs tendances se dégagent :

i) L'absence de couleur dans la première colonne démontre que l'activité du complexe en absence de protéine est faible, voire nulle dans la majorité des cas. Il existe cependant quelques exceptions, il s'agit du **Biot-3¹-1**, du **Biot-4^o-1**, du **Biot-(S)-Phe-1**, **Biot-(R)-Pro-1** et du **Biot-(S)-Pip-1**. En présence de protéine, la catalyse est accélérée.

ii) Dans la partie haute de l'empreinte, qui correspond aux résultats obtenus avec les ligands achiraux, seul le ligand **Biot-4^o-1** montre une activité et une sélectivité intéressantes (carrés colorés). Ce ligand est majoritairement (*R*) sélectif (carrés verts).

iii) Dans la partie basse de l'empreinte digitale, qui correspond aux résultats obtenus avec les ligands chiraux, il est intéressant de remarquer que les ligands **Biot-(R)-Pro-1** et **Biot-(R)-Pip-1** sont (*S*) sélectifs (carrés roses) et inversement les ligands **Biot-(S)-Pro-1** et **Biot-(S)-Pip-1** sont (*R*) sélectifs (carrés verts). Cependant, les ligands avec l'espaceur phénylalanine ne suivent pas cette tendance et donnent aussi bien le produit (*S*) que le produit (*R*) (présence de carrés roses et verts), indépendamment de la configuration de l'espaceur.

iv) Enfin l'avidine sauvage donne de bonnes conversions avec tous les catalyseurs hybrides testés (carrés foncés).

Ces constatations générales soulignent le potentiel de l'optimisation des métalloenzymes artificielles, tandis que l'optimisation génétique peut être vue comme la dernière étape d'optimisation, dans laquelle l'environnement de la seconde sphère de coordination du métal est légèrement modifié. De plus, la catalyse en présence de protéine montre en général de meilleures conversions que sans celle-ci.

2.2.4. Sélection de résultats testés avec le précurseur métallique $[\text{PdCl}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})]_2$.

Le changement du précurseur métallique du $[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$ précurseur métallique $[\text{PdCl}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})]_2$ se traduit par une meilleure activité (tableau II 2.3, entrée 1 et 2). Les résultats les plus intéressants du criblage sont reproduits avec ce précurseur au palladium (tableau III 2.3).

Tableau III 2.3. Résumé numérique d'une sélection de résultats pour l'alkylation allylique asymétrique.

Entrée ^[a]	Ligand	Protéine	ee (%)	Conv. (%) ^[b]
1	Biot-4^o-1	S112A	90	95
2	Biot-4^o-1	S112A	88 ^[c]	80 ^[c]
3	Biot-4^o-1	S112G	88	95
4	Biot-4^o-1	S112G-N118T	87	96
5	Biot-4^o-1	S112Q	-31	96
6	Biot-(R)-Phe-1	–	-36	5
7	Biot-(R)-Phe-1	WT Avi	-65	77
8	Biot-(S)-Pro-1	–	–	< 5
9	Biot-(S)-Pro-1	S112A	75	81
10	Biot-(S)-Pro-1	S112F	81	74
11	Biot-(S)-Pro-1	S112Y	80	87
12	Biot-(R)-Pro-1	–	-55	12
13	Biot-(R)-Pro-1	S112G	-54	96
14	Biot-(R)-Pro-1	S112G-V47G	-82	92
15	Biot-(R)-Pro-1	S112T	-68	98
16	Biot-(R)-Pro-1	WT Avi	-72	89
17	Biot-(S)-Pip-1	–	46	31
18	Biot-(S)-Pip-1	S112H	73	99
19	Biot-(R)-Pip-1	–	–	< 5
20	Biot-(R)-Pip-1	S112L	-74	65
21	Biot-(R)-Pip-1	S112M	-73	88

^[a]Conditions expérimentales : le précurseur est préparé in situ dans du DMSO $[\text{PdCl}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})]_2$ 0.02 éq., ligand biotinylé 0.048 éq. et mélangé à une solution aqueuse contenant : une concentration en site actif de protéine 0.054 éq., K_2CO_3 5 éq., DMB 2 éq., $\text{H}_2\text{C}(\text{CO}_2\text{Me})$ 5 éq. et le $[\text{substrat}] = 4 \text{ mM}$ (concentration finale), 1 éq. Le volume final est de 435 μL , DMSO : $\text{H}_2\text{O} = 1 : 10$. La réaction est agitée pendant 16 h à température ambiante. ^[b]Conv.= conversion. Aucun produit de départ n'est détecté, seul le produit d'hydrolyse et le produit alkylé sont détectés. ^[c]catalyse effectuée avec $[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$.

Sur la base de ces résultats, plusieurs tendances se dégagent :

i) Le fait d'utiliser le précurseur métallique $[\text{PdCl}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})]_2$ donne non seulement une meilleure activité mais aussi une meilleure énantiosélectivité (entrées 1 et 2 du tableau III 2.3). En absence de la protéine, quelques-uns des ligands énantio-purs donnent un enrichissement énantiomérique du produit d'alkylation, bien que dans la plupart des cas cela reste modéré (46% ee et 31% conversion pour le **Biot-(S)-Pip-1**, Tableau III 2.3 entrée 17). L'incorporation du complexe de palladium dans la (strept)avidine augmente de façon significative l'activité et la sélectivité de la métalloenzyme artificielle (comparer les entrées 8 avec 9-11, 12 avec 14-16, 17 avec 18 et 19 avec 20-21).

ii) La conformation contrainte de l'espaceur portant un (**Biot-Pip-1** et **Biot-Pro-1**) ou deux atomes de carbone (**Biot-4^o-1**) donnent les meilleures performances en termes d'activité et de sélectivité.

iii) Les catalyses effectuées avec le $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4^o-1}]^+ \subset \text{S112X Sav}$ ressortent clairement en terme de sélectivité et d'activité. Avec ce ligand, le produit d'alkylation (*R*) est favorisé pour la plupart des mutants de la streptavidine (90% ee (*R*) et 95% conversion avec $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4^o-1}]^+ \subset \text{S112A Sav}$, tableau III 2.3, entrées 1-4).

Néanmoins, la combinaison $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+ \subset \text{S112Q Sav}$ donne le produit d'alkylation (*S*) (31% ee (*S*), 96% conversion, Tableau III 2.3, entrée 5), démontrant le potentiel de l'optimisation génétique.

iv) Pour les ligands avec un espaceur proline ou pipéridine, **Biot-Pro-1** ou **Biot-Pip-1**, les résultats obtenus sont similaires. Quand la configuration de l'espaceur est (*R*), le produit d'alkylation (*S*) est obtenu alors que quand la configuration de l'espaceur est (*S*), le produit d'alkylation (*R*) est obtenu. La meilleure sélectivité en faveur de l'énantiomère (*S*) est obtenue avec une protéine portant deux mutations ponctuelles : $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-(R)-Pro-1}]^+ \subset \text{S112G-V47G Sav}$, 82% ee (*S*) et 92% conversion (Tableau III 2.3, entrée 14).

2.3. Evaluation de l'état de la protéine après la catalyse.

Dans le cas de l'alkylation allylique asymétrique, les conditions réactionnelles sont assez dures pour la protéine. L'utilisation d'une base et d'un surfactant provoque un risque de dénaturation de la protéine. En effet, il y a apparition d'un précipité lors de l'ajout de la base. Dans ce contexte, il est intéressant de déterminer la nature du précipité.

2.3.1 Evaluation de tous les paramètres de la catalyse sur la nature du précipité.

Dans cette expérience, il s'agit de déterminer quelles sont les espèces qui précipitent par de simples expériences dans lesquelles tous les composants sont ajoutés un à un à la catalyse, pour observer l'influence de chacun et ainsi identifier les espèces qui forment ce précipité.

Pour ces expériences, les mêmes solutions sont utilisées que celles employées pour la catalyse (aux mêmes concentrations) : à 20 μL d'une solution de complexe préparé *in situ* dans du DMSO avec du $[\text{PdCl}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})]_2$ (0.02 éq.) et du ligand biotinylé (0.048 éq.) est ajoutée 275 μL d'une solution de protéine à 0.054 éq. en sites actifs. Puis, ces solutions sont ajoutées : 10 μL d'une solution de substrat, 10 μL d'une solution de malonate de diméthyle, 60 μL d'une solution de surfactant et 60 μL d'une solution de base.

Les résultats de ces tests sont résumés dans le tableau III 2.4. Pour aider à la lisibilité du tableau, une croix marque la présence du composé et un tiret son absence.

Tableau III 2.4 Test de précipitation

Essai	Protéine	Complexe	Substrat	Malonate	Surfactant	Base	Présence de précipité
1	X	X	-	-	-	-	Non
2	X	-	-	X	-	-	Non
3	X	-	-	-	-	X	Non
4	X	-	-	-	X	-	Non
5	X	-	-	X	-	X	Non
6	X	X	X	-	-	-	Oui
7	-	-	X	-	-	-	Oui
8	X	X	-	-	X	X	Oui
9	X	-	-	-	X	X	Oui

De ce tableau, nous pouvons dégager quelques conclusions intéressantes :

i) La présence de surfactant, base et protéine (avec ou sans complexe) donne lieu à la formation d'un précipité (entrée 8 et 9).

ii) Le substrat n'est pas très soluble dans la solution de catalyse (entrée 6 et 7). Un précipité est observé lorsque le substrat est présent en solution aqueuse. Le surfactant aide à sa solubilisation. Une information n'est pas présente dans ce tableau car difficilement quantifiable. En effet, lors de l'ajout du surfactant à une solution contenant du substrat, la solution légèrement turbide a tendance à se clarifier au bout de quelques minutes d'agitation.

Ces tests ont permis d'identifier deux composants susceptibles de former le précipité. Il s'agit du substrat et de la protéine. Néanmoins, il apparaît clairement que la protéine précipite dans les conditions réactionnelles. La transformation du substrat en produit d'alkylation prouve que sa solubilité est néanmoins suffisante.

2.3.2. Evaluation de la conformation de la protéine par électrophorèse sur SDS-PAGE.

Afin d'analyser la nature du précipité et d'évaluer l'état de dénaturation de la protéine durant la catalyse, un gel électrophorétique de protéine a été réalisé dans les conditions de la catalyse, c'est-à-dire en présence de surfactant et à un pH égal à 11. Le principe de cette expérience est de faire migrer la protéine sur un gel de polyacrylamide sous un champ électrique. La protéine migre de façon différente suivant sa masse moléculaire et son état d'agrégation.

Les expériences ont été faites avec les biochimistes de notre groupe et en particulier le Dr. Creus et Mme Sardo. Une solution de protéine est mélangée avec une solution de complexe formé *in situ*, une solution de surfactant et une solution de base. Une fois le mélange obtenu, une petite quantité de la suspension est prélevée. Ensuite, le reste de la solution est centrifugé à 14000 tours/minute pendant 2 minutes. La solution initiale, la solution surnageante limpide, ainsi qu'un échantillon du précipité (culot résultant de la centrifugation) sont analysés par gel électrophorétique.

Les gels sont présentés dans les figures III 2.11 et III 2.12.

a)

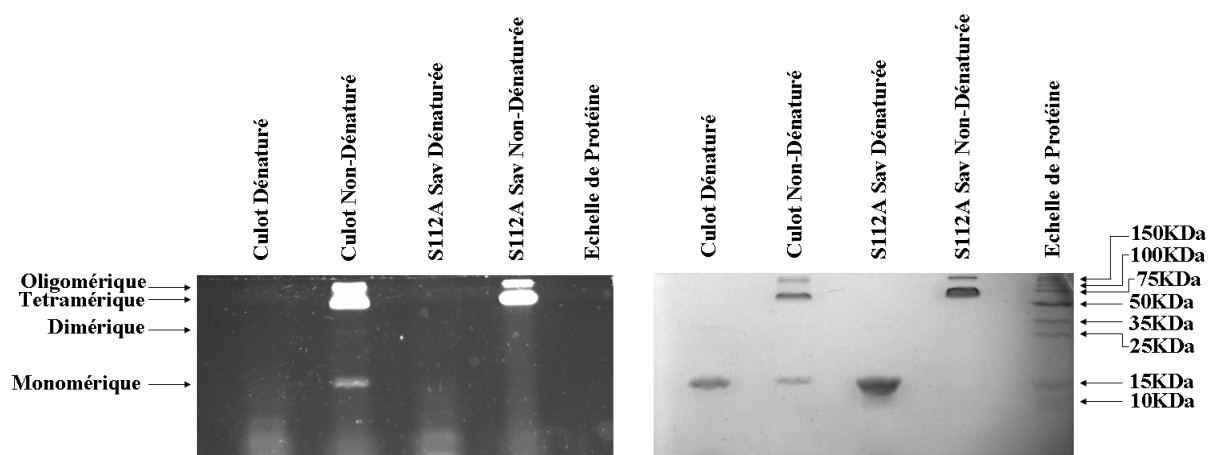


Figure III 2.11 Gel de protéine (SDS-PAGE : Sodium-Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) de la métalloenzyme artificielle $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^0\text{-1}]^+ \subset \text{S112A Sav}$.

Il est bien établi que la streptavidine active non dénaturée peut-être détectée par la technique SDS-PAGE en utilisant la fluorescéine biotylée comme révélateur spécifique (photos de gauche des figures III 2.11 et III 2.12).^[87,188] Le même gel peut également être révélé avec le bleu de comassie afin de visualiser toutes les protéines (photos de droite des figures III 2.11 et III 2.12).

a) Le culot contient de la streptavidine (*Culot Non Dénaturé*) qui est capable de lier la fluorescéine biotylée. Les propriétés migratoires de la protéine présentent dans le culot sont similaires à la migration de la S112A Sav utilisé comme contrôle (*S112A Sav Non-Dénaturée*), avec la correspondance attendue au niveau masse moléculaire (Echelle de Protéine). La S112A Sav de contrôle (*S112A Sav Non-Dénaturée*) qui contient aussi du complexe $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^0\text{-1}]^+$, est dissoute dans de l'eau (*i.e.* dans les conditions où nous savons que la protéine est totalement soluble et active). Dans tous ces cas, le complexe $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^0\text{-1}]^+$ est déplacé par la fluorescéine biotylée, qui a plus

d'affinité que le complexe biotinylé. La métalloenzyme artificielle migre en grande majorité comme une protéine tétramérique dans toutes les conditions non-dénaturantes testées, bien qu'une augmentation de streptavidine monomérique soit visible en présence d'un pH élevé et de DMB (*Culot Non-Dénaturé*) en comparaison avec les conditions du contrôle (*S112A Sav Non-Dénaturée*). Ce monomère conserve sa capacité de se lier avec la biotine. Seulement après incubation à 110°C pendant 20 minutes, le culot re-suspendu montre de la protéine monomérique inactive dénaturée (*Culot Dénaturé*). C'est aussi le cas de la S112A Sav de contrôle (*S112A Sav Dénaturée*).

b)

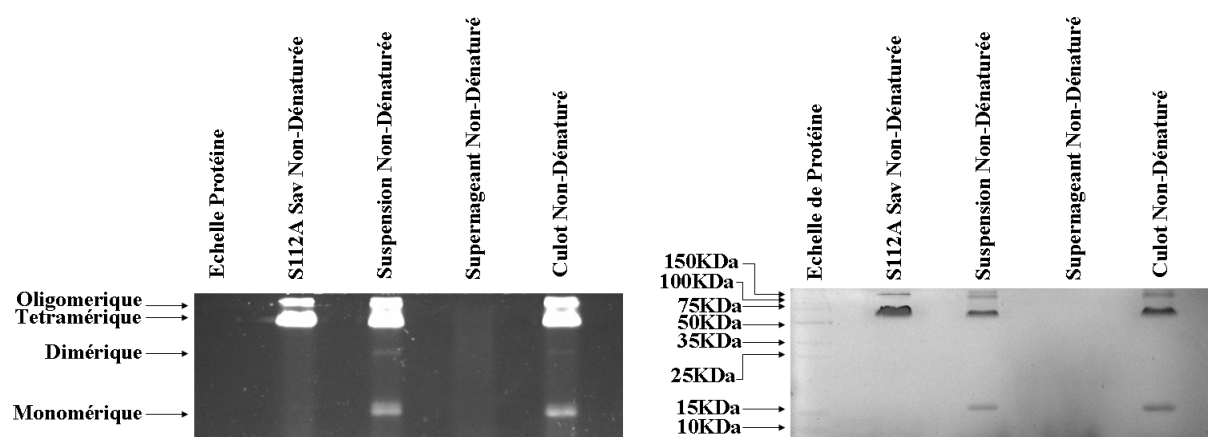


Figure III 2.12 Gel de protéine (SDS-PAGE : Sodium-Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) de la métalloenzyme artificielle $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^0\text{-1}]^+ \subset \text{S112A Sav}$.

b) Comme décrit ci-dessus, la suspension formée par la métalloenzyme artificielle $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^0\text{-1}]^+ \subset \text{S112A Sav}$ contient de la protéine active capable de se lier avec la fluorescéine biotinylée (*Suspension Non-Dénaturée*). Elle peut-être séparée en un culot contenant toute la protéine active (*Culot Non-Dénaturé*) et un surnageant limpide (*Surnageant Non-Dénaturé*). Le surnageant ne contient aucune trace visible de protéine. A la différence, la protéine présente dans le culot (*Culot Non-Dénaturé*) montre une

migration similaire par rapport au contrôle de la protéine non dénaturée (*S112A Non-Dénaturée*). Lorsque le culot est re-suspendu en solution aqueuse contenant tous les réactifs de la catalyse (excepté la protéine et le complexe), le comportement catalytique est proche de la suspension originale (cette catalyse donne 90% ee (70% conv.) à comparer à 90% ee (95% conv.).

Ces analyses confirment que la métalloenzyme artificielle, bien qu'étant sous forme de suspension, reste active et non dénaturée dans les conditions utilisées pour l'alkylation allylique asymétrique.

De plus, une catalyse sans surfactant a été réalisée avec le mutant de la streptavidine qui donne la meilleure énantiosélectivité (*S112A*) et avec le précurseur au palladium qui donne la meilleure conversion ($[\text{PdCl}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})]_2$). Cette catalyse donne 95% ee (17% de conversion) à comparer avec le résultat de la catalyse avec surfactant qui est de 90% ee (95% de conversion). La présence d'un surfactant dans la catalyse permet d'obtenir de meilleure conversion (+73% conversion) au détriment d'une érosion de la sélectivité (-5% ee).

2.3.3 Evaluation de la conformation de la protéine par dichroïsme circulaire.

Une autre façon d'analyser la métalloenzyme artificielle dans les conditions de l'alkylation allylique asymétrique est l'analyse par dichroïsme circulaire. Ces expériences sont réalisées à un pH élevé (pH= 11.1) et en présence de surfactant, dans le but d'étudier l'incidence des conditions de catalyses sur les bandes caractéristiques de la protéine, situées entre 250 et 300 nm en dichroïsme circulaire (présence de feuillet β). (Figure III 2.13)

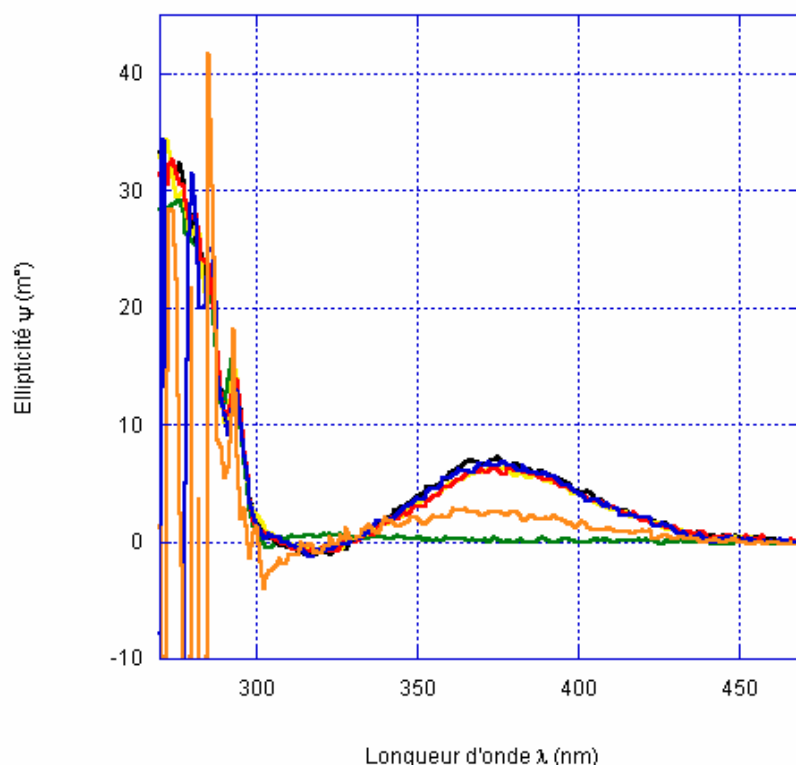


Figure III 2.13. Spectres de dichroïsme circulaire de la WT Sav (courbe verte) ; WT Sav et $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-1}]^+ \subset \text{WT Sav}$ (courbe jaune) ; $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-1}]^+ \subset \text{WT Sav}$ et surfactant (courbe noire),) ; $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+ \subset \text{WT Sav}$, surfactant et malonate de diméthyle (courbe rouge) ; $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+ \subset \text{WT Sav}$, surfactant, malonate de diméthyle et substrat (courbe bleue) et $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+ \subset \text{WT Sav}$, surfactant, malonate de diméthyle, substrat et base (courbe orange). $[\text{métalloenzyme artificielle}] = 33 \mu\text{M}$.

Les bandes caractéristiques de la protéine (les hélices à 290 nm et les feuillets β à 270 nm) sont toujours présentes dans les conditions de la catalyse sans base (courbe bleue). Cela suggère que même dans des conditions dures (présence de surfactant) la protéine reste active. L'apparition du précipité rend impossible l'interprétation du spectre après l'ajout de base. De plus, un signal CD qui apparaît à 380 nm quand le complexe est ajouté à la protéine prouve

que le complexe se trouve dans un environnement chiral. Il serait intéressant de pouvoir corréler les résultats de la catalyse avec ceux obtenus lors des expériences de dichroïsme circulaire. Les premières expériences sont présentées dans la figure III 2.14 ci-dessous.

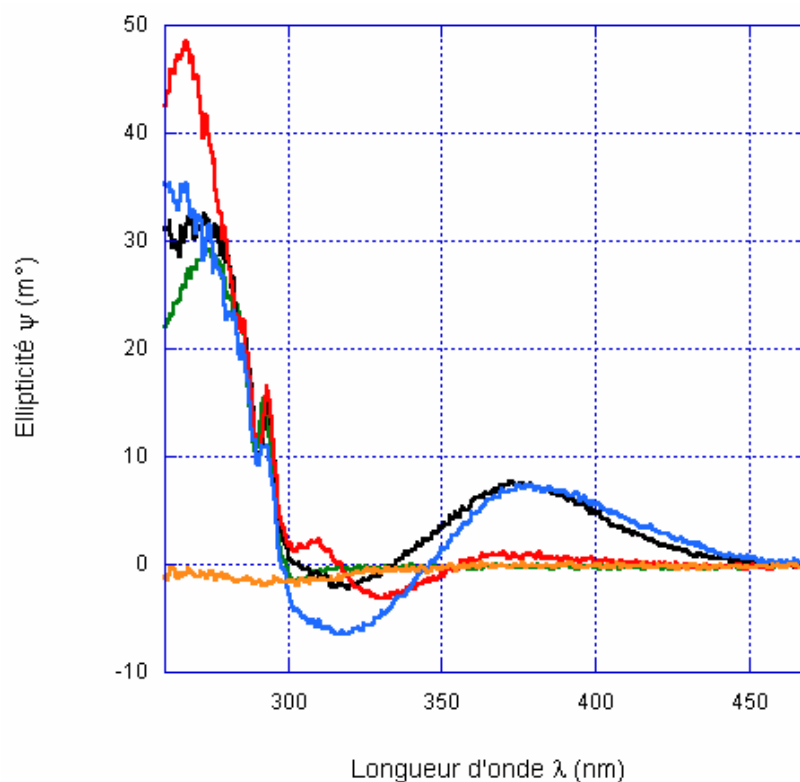


Figure III 2.14. Spectres de dichroïsme circulaire du $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+$ (courbe orange), WT Sav (courbe verte), $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-1}]^+ \subset \text{WT Sav}$ (courbe noire), $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+ \subset \text{S112A Sav}$ (courbe rouge) et $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+ \subset \text{S112Q Sav}$ (courbe bleue). $[\text{métalloenzyme artificielle}] = 33 \mu\text{M}$.

Pour cette expérience, les exemples, choisis sont la streptavidine WT avec le complexe $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-1}]^+$ et les mutants S112A et S112Q streptavidine avec $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+$. Les deux mutants en position S112 avec le complexe $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+$ ont été choisis en raison des résultats de catalyse bien différents. En effet, pour la première mutation, la meilleure énantiosélectivité pour la formation de l'énantiomère

(*R*) est obtenue avec 90% ee. La deuxième mutation donne l'énantiomère (*S*) avec 31% ee. Les deux courbes sont très différentes, cela semble confirmer la forte influence de l'environnement chiral sur l'approche du substrat. En l'état actuel des expériences, il est néanmoins impossible de prédire le résultat de la catalyse avec cette méthode analytique.

2.3.4. Influence de la base sur la catalyse.

Des conditions basiques sont nécessaires à la déprotonation, même partielle, du nucléophile. Le malonate de diméthyle a un pK_a de 12.9.

Du fait de la précipitation de la protéine, plusieurs bases ont été testées pour déterminer l'incidence sur la catalyse et pour voir laquelle est la plus compatible avec la présence de protéine.^[187,189] Pour ce test, un incrément du nombre d'équivalent de base par rapport au substrat (1-5 éq.) a été réalisé. La combinaison **Biot-(*R*)-Pro-1** et $[PdCl(\eta^3-Ph_2allyl)]_2$ comme précurseur du palladium a été utilisée, car celle-ci donne de meilleures conversions. Les résultats sont présentés dans la figure III 2.15.

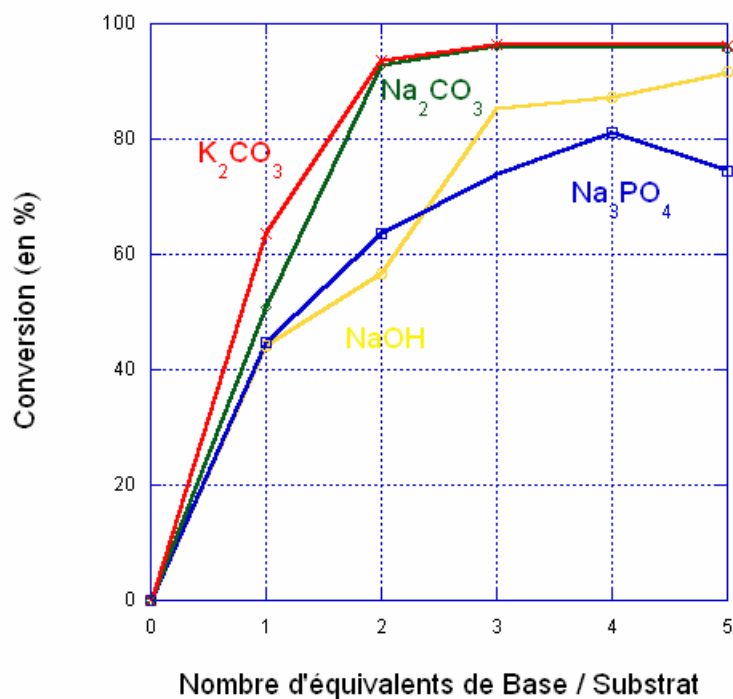


Figure III 2.15. Représentation de la conversion vs. équivalents de bases.

Les résultats obtenus en catalyse montrent une bonne activité pour les 4 bases testées. Dans les cas du carbonate de sodium ou de potassium, la conversion observée augmente avec le nombre d'équivalents de base allant jusqu'à 5 équivalents de base par rapport au substrat. Pour ce rapport, une conversion totale du substrat en produit d'alkylation a été atteinte. Pour le phosphate de sodium, la conversion diminue à partir de 4 éq.. Pour la soude, la conversion croît jusqu'à 5 éq. sans être totale.

Pour 5 éq. de K_2CO_3 , le pH de la catalyse a été mesuré. Il est égale à 11.1.

3. Conclusions et perspectives.

Cette étude a permis de développer une nouvelle génération de catalyseurs hybrides efficaces pour l'alkylation allylique asymétrique. A ce jour, aucune enzyme n'est connue pour réaliser une réaction de couplage C-C. De plus, notre système de métalloenzymes artificielles est le premier exemple dans la littérature qui catalyse une réaction de couplage C-C. Cela démontre le potentiel du système de métalloenzymes artificielles développé au sein du laboratoire. En effet, en combinant 14 complexes et 22 protéines, une librairie de plus de 300 catalyseurs hybrides a été générée. Avec l'acétate de 1,3-diphényl-2-propényle, ces métalloenzymes artificielles se sont révélées hautement sélectives. Des excès énantiomériques de 90% en faveur de l'énantiomère (*R*) avec le catalyseur $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+ \subset \text{S112A Sav}$ et de 82% en faveur de l'énantiomère (*S*) avec le catalyseur $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-(R)-Pro-1}]^+ \subset \text{S112G-V47G Sav}$ ont été obtenus. Ces résultats ont été obtenus grâce à une évolution chimio-génétique du système.

La diversité observée peut être introduite chimiquement par des modifications du complexe organométallique biotinylé. La modification du ligand par des différents espaceurs acides aminés peut induire une sélectivité inverse, permettant d'obtenir les deux énantiomères avec de bons excès énantiomériques. Cette modification joue également un rôle important sur l'activité du complexe. Des mutations de la protéine hôte permettent de moduler et d'augmenter la sélectivité. Les mêmes constats ont pu être faits pour les autres réactions développés au sein du laboratoire, comme le transfert hydrogérant^[80] et l'hydrogénation,^[77] pour lesquelles les mutations à proximité du site catalytique (position 112 et boucle 7-8) offrent une bonne stratégie d'optimisation de la sélectivité.

Les expériences de dichroïsme circulaire confirment que l'environnement autour du complexe est chiral. Des études plus approfondies sur l'effet des mutations sur la protéine pourraient permettre d'étendre notre connaissance sur le système de métalloenzymes artificielles. Ce travail a également mis en valeur le fait que la protéine reste active même soumise à des conditions de catalyses dures (pH élevé et présence d'un surfactant).

Les bons résultats obtenus avec ce substrat peu soluble dans l'eau ouvrent la voie à l'utilisation d'autres substrats beaucoup moins solubles qui sont utilisés en catalyse homogène dans des solvants organiques et qui sont plus intéressants en vue d'une application de cette réaction au niveau industriel. Il est évident que le potentiel de ce système réside dans son potentiel d'évolution et de variabilité, quasiment infini.

Actuellement, les efforts se concentrent sur la cristallisation de la métalloenzyme artificielle pour obtenir une information précise sur l'environnement du complexe. Ceci permettrait de moduler les mutations sur la protéine de façon plus précise.

Enfin, pour étendre le champ d'applications des catalyseurs hybrides et de la technologie biotine-(strept)avidine en particulier, d'autres réactions de formation de liaison carbone-carbone peuvent être développées comme les réactions de Suzuki, Heck ou Sonogashira. Quelques essais ont d'ores et déjà été réalisés dans le groupe.

Chapitre IV : Troisième sphère de coordination : Synthèse de ligands biotinylés pour la création de structures 1D et 2D par auto-assemblage hiérarchique de streptavidine.

1. Introduction.

La réalisation de briques moléculaires simples possédant l'information nécessaire à la reconnaissance moléculaire dans le but de créer de nouvelles architectures chimiques a pris une ampleur considérable ces 20 dernières années. Des structures métallo-organiques poreuses aux cages moléculaires, en passant par la construction de nouvelles structures cristallines, la technique « mélanger et agiter » (« shake and bake ») a permis l'élaboration de principes pour la construction de nouveaux matériaux organiques et inorganiques.^[190-205]

Les principaux développements dans ce domaine de la chimie supramoléculaire concernant l'auto-assemblage de structures multidimensionnelles (uni-, bi-, tri-dimensionnelles) en présence d'un métal. La formation de ces architectures macromoléculaires complexes permet la création de cavités adaptables pour différentes molécules cibles. Le couple molécule invitée-complexe d'accueil montre souvent des propriétés peu communes telles que la réactivité chimique, le transfert d'énergie ou d'électrons, la grande capacité de stockage des gaz, la catalyse, etc.^[206,207,205,109,200]

Parallèlement à ces développements, la surface et les cavités d'une protéine à très grand degré d'agrégation ont également été exploitées pour l'encapsulation moléculaire ou comme patron pour la synthèse de nanoparticules. Plusieurs exemples de telles protéines

existent dans la littérature : fibril,^[208,209] ferritine,^[210,211] S-layers,^[212-214] anti-corps,^[112] peptides amphiphiles,^[215] capsides,^[216-219] leucine zipper^[220] etc.^[221-226]

Inspiré par ces exemples, nous nous sommes intéressés à la création de polymères coordonnés en utilisant un couple hôte-invité basé sur la forte affinité entre une protéine et un ligand organique. Dans ce contexte, l'utilisation de la technologie biotine-(strept)avidine apparaît évidente pour la création des structures complexes multidimensionnelles. Afin de varier les propriétés de ces macrostructures, plusieurs types de ligands peuvent être considérés :

- molécule invitée possédant un métal qui, suivant sa géométrie, impose la structure multidimensionnelle du polymère.
- molécule invitée purement organique qui, par sa géométrie, permet d'accéder à des structures multidimensionnelles.

Le choix et la synthèse des ligands représentent donc un aspect crucial de ce projet. La caractérisation des polymères obtenus est l'autre défi de cette étude. Il existe plusieurs façons de visualiser les polymères, dont les plus couramment utilisées sont la microscopie à force atomique (AFM), la microscopie électronique à balayage (SEM ou MEB) ou encore la microscopie électronique à transmission (TEM).

Ce chapitre est divisé en deux parties : la première décrit la synthèse des différents ligands biotinylés et la seconde présente les différents essais d'obtenir et de caractériser les polymères par microscopie.

2. Résultats et Discussion.

2.1. Concepts et généralités.

Afin de concevoir des polymères coordonnés de protéine, à l'aide de la technologie biotine-streptavidine, il est préalablement nécessaire de définir des stratégies de développement de nouveaux ligands biotinylés, ainsi que la mise au point de conditions de réaction.

La première stratégie (stratégie I, figure IV 2.1) consiste à utiliser un ligand qui possède un motif central et plusieurs ramifications contenant un motif biotine. La disposition des ramifications définit la géométrie finale du polymère coordonné. Avec un bras suffisamment long et en fonction des concentrations des espèces en solution, on peut imaginer un même ligand pourrait se lier à des sites actifs d'une même protéine ou de deux protéines différentes, provoquant ainsi une croissance du polymère de protéines. Pour cette stratégie, la liberté du ligand de se lier avec 2 ou 3 protéines de manières différentes peut permettre la polymérisation d'un plus grand nombre de protéines. La formation du polymère de protéines permet l'évaluation des différentes techniques d'analyse en microscopie.

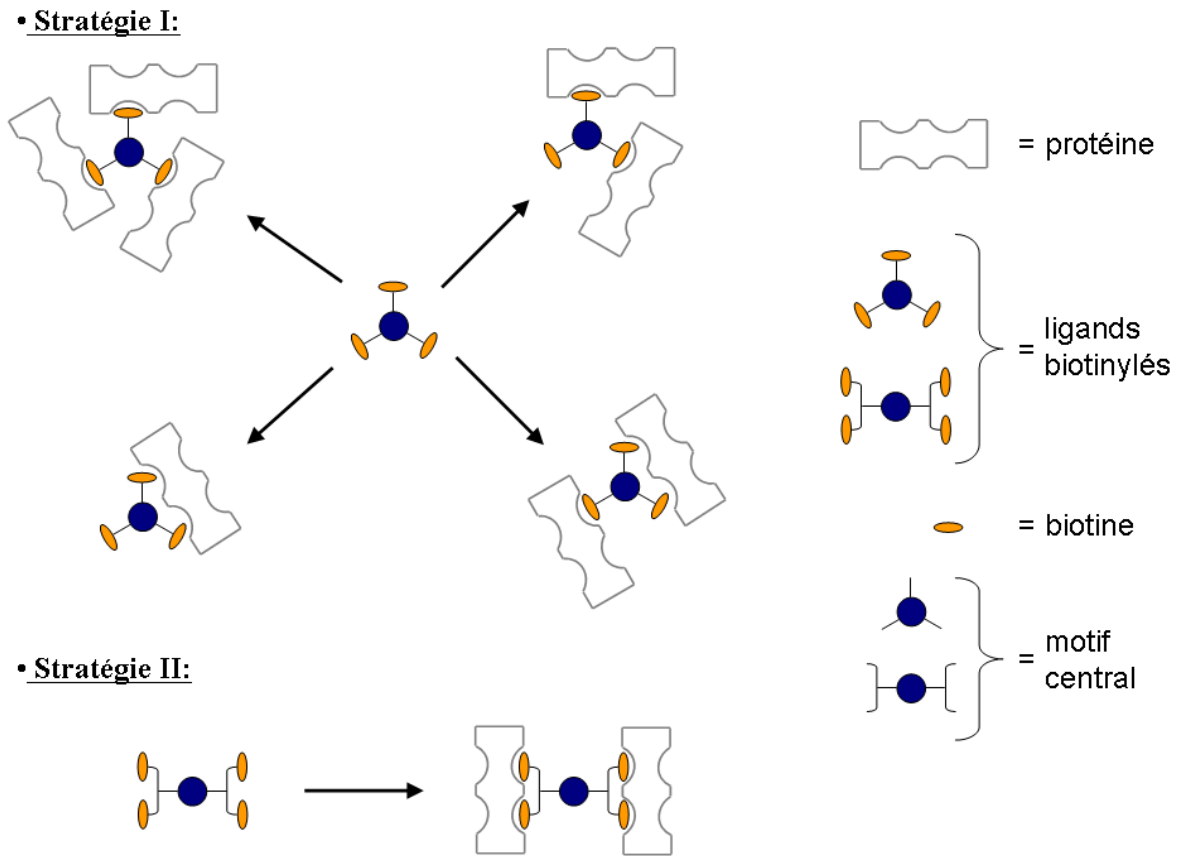


Figure IV 2.1 Représentation des différents monomères des deux stratégies envisagées pour le développement de ligands biotinylés pour la création de polymère de protéine.

La deuxième stratégie (stratégie II, figure IV 2.1) pour la formation de polymères et la synthèse de ligand a été inspiré par les travaux du groupe Stayton.^[227-229] Ce groupe exploite le système biotine-streptavidine dans le but de développer des traitements anti-cancer. Les ligands biotinylés étudiés par ce groupe ont la particularité de posséder un motif central avec deux biotines qui peuvent se lier de façon spécifique sur les deux sites actifs *cis* de la protéine. L'écartement entre les deux motifs biotinylés doit être suffisamment grand pour pouvoir lier les deux sites *cis* de la protéine, sans être trop grand pour ne pas lier deux sites *trans* de la protéine. Les deux systèmes synthétisés par Stayton et al. sont représentés dans la figure IV 2.2. L'écartement entre les deux fonctions carbonyle de la chaîne latérale de la biotine est de 31 Å, 40 Å respectivement.

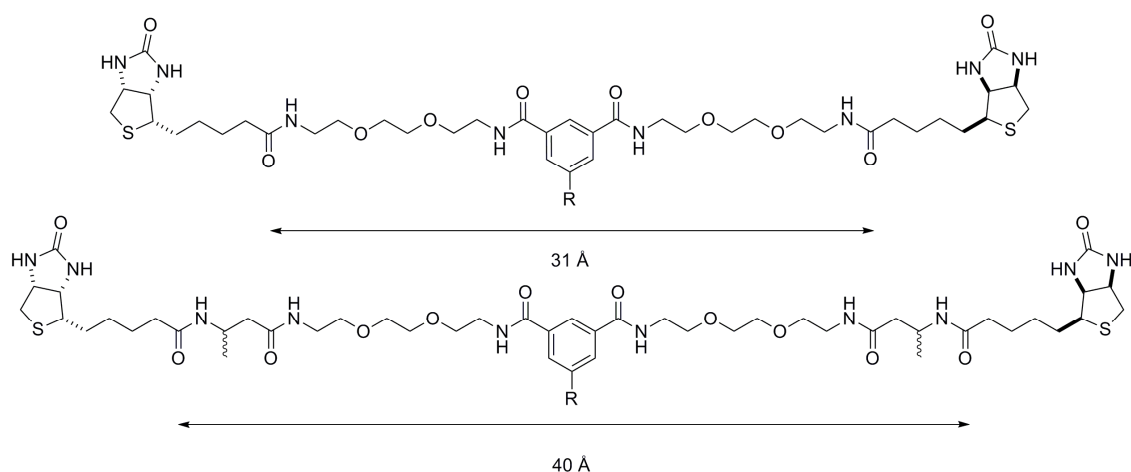


Figure IV 2.2 Représentation de la distance entre les deux carbonyles de la chaîne latérale de la biotine dans les deux ligands bis-biotinylés synthétisés par Stayton et al.

Les expériences menées par ce groupe montrent qu'il faut deux molécules bis-biotinylés pour saturer les sites actifs de la streptavidine (ou de l'un de ces mutants). Etant donné que l'avidine possède des sites actifs beaucoup plus ouverts en comparaison à la streptavidine, les mêmes ligands peuvent être utilisés en combinaison avec l'avidine.

L'association de 2 systèmes bis-biotinylés permet la création d'un ligand tétra-biotinylé, qui peut jouer le rôle de connecteur de 2 streptavidine, permettant ainsi la croissance du polymère de protéines. Cette association peut se faire soit par formation d'un complexe métallique entre les 2 entités bis-biotinylés (R contient un groupement chélatant, figure IV 2.2), soit en les liant de façon covalente (R= espaceur organique dans la figure IV 2.2).

Dans toutes les synthèses, l'emploi d'éthylène glycol comme motif espaceur présente l'avantage d'augmenter la solubilité du ligand organique dans l'eau et d'autre part d'accroître la flexibilité du ligand et permettre une meilleure reconnaissance moléculaire.

Ces stratégies ont été appliquées à la formation de polymères de streptavidine. Différentes techniques d'analyse en microscopie ont été employées pour la visualisation des résultats.

2.2. Synthèse des différents ligands.

2.2.1. Première stratégie : synthèse d'un ligand tris-biotinylé.

La synthèse du ligand **2** permet l'introduction simple de 3 espaceurs de type éthylène glycol et de 3 fragments biotinylés, en partant d'un motif central contenant 3 ramifications (figure IV 2.3). Néanmoins, la (strept)avidine possédant quatre sites actifs, le ligand **2** n'est pas optimal pour créer une macrostructure multidimensionnelle parfaitement ordonnée. De plus, les deux étapes de la synthèse ne donnent pas de bons rendements.

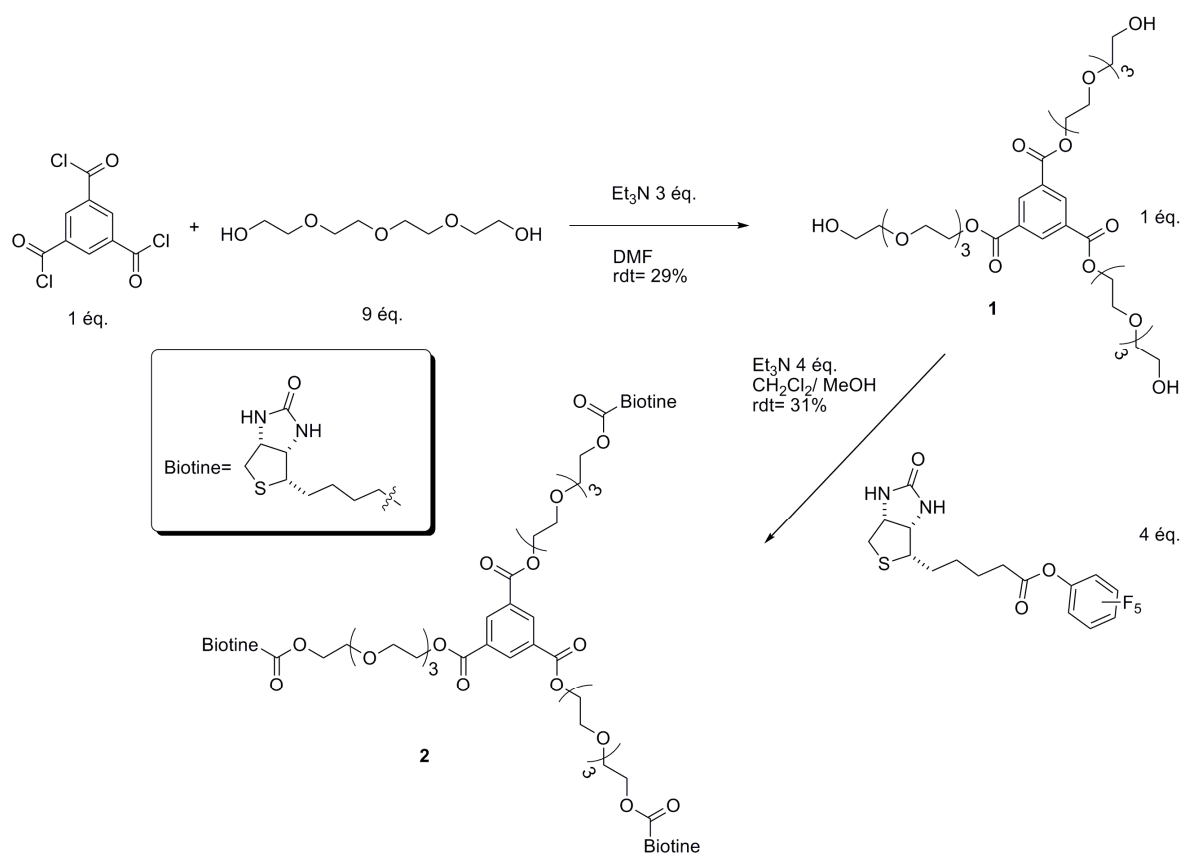


Figure IV 2.3. Synthèse du ligand tris-biotinylé **2**.

Le rendement global de la synthèse est modeste, essentiellement dû à la formation de sous-produits de mono- et di-substitution lors de la première étape. Par ailleurs, la purification par séparation sur colonne chromatographique est rendue difficile par la présence de ces sous-produits.

Pour la deuxième étape, la faible nucléophilie de l'alcool **1** est le premier facteur expliquant le rendement modeste. De plus, le motif biotinylé, très polaire, rend la purification délicate (solubilité faible dans des solvants autres que DMF, eau, méthanol).

Toutefois après ces deux étapes, le produit désiré est obtenu pur et en assez grande quantité pour être testé en vue de la création de polymère de protéine.

2.2.2. Deuxième stratégie : synthèse d'un complexe métallique tétra-biotinylé.

Inspiré par les travaux de Stayton et al.,^[228,229] nous avons utilisé un motif central bis-biotinylé relié à un groupement chélatant de type pyridine, pour former le ligand **6** (figure IV 2.4). Ainsi, 2 ligands bis-biotinylés peuvent être connectés par complexation des pyridines avec un métal. Dans l'esprit des polymères coordonnés, l'utilisation d'un métal comme connecteur (possibilité de varier la géométrie du polymère en utilisant un autre métal) conjugué avec le couple protéine-ligand biotinylé permet la création de structures de protéines métalliques organiques uni-, bi- ou tridimensionnelles (MOPF : « Metal-Organic Protein Frameworks»). La distance entre les deux biotines est optimisée pour se fixer aux deux sites actifs *cis* de la streptavidine. Le métal Ag(I) a été choisi comme chélate des groupements pyridine, pour assurer une connexion linéaire entre les quatre motifs biotinylés.

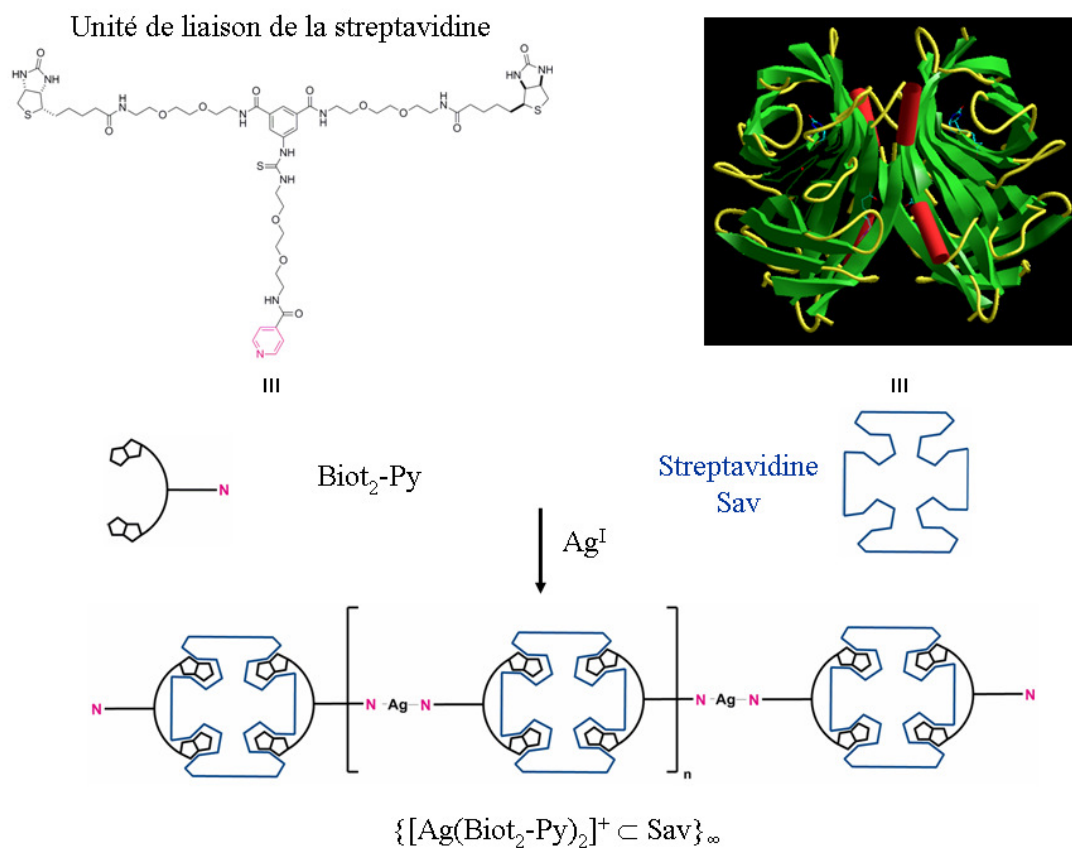


Figure IV 2.4. Représentation de la structure du ligand Biot₂-Py, la partie organique (en noir) et la pyridine (rose), après réaction avec Ag(I). Il forme un connecteur linéaire possédant 4 motifs biotinylés, le complexe $[Ag(Biot_2-Py)_2]^+$. L'ajout de streptavidine devrait permettre la formation du polymère linéaire $\{[Ag(Biot_2-Py)_2]^+ \subset Sav\}_\infty$.

Cette synthèse présente certains avantages, comme la possibilité de varier la position terminale en couplant différents motifs chélates (terpyridine ou bipyridine) ou la variation de la longueur du bras qui relie le motif central au motif chélate terminal.

La synthèse du ligand **6** est présentée dans la figure IV 2.5.

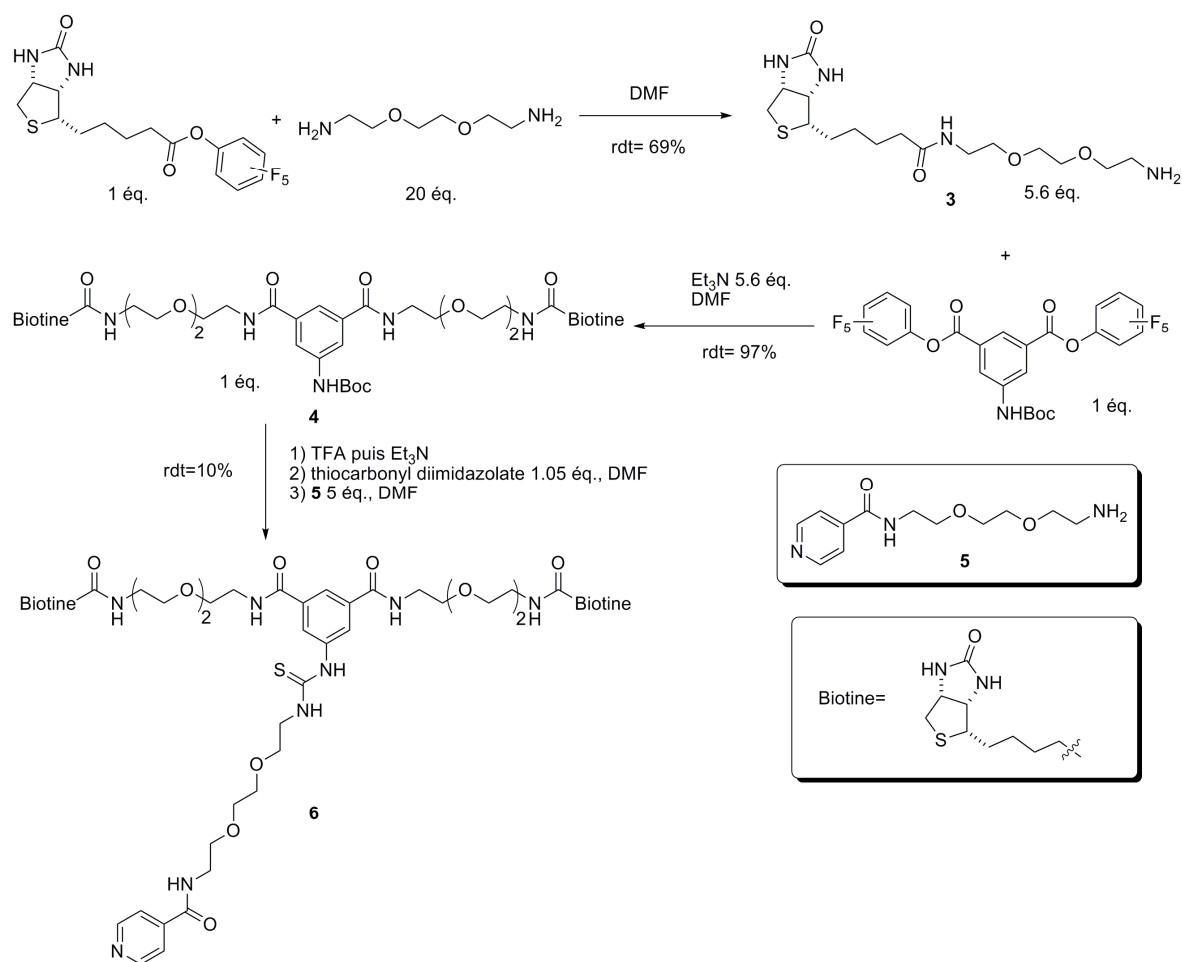


Figure IV 2.5. Synthèse du ligand bis-biotinylé **6**.

La synthèse de l'amine **4** est réalisée suivant le protocole mis au point par le groupe de Stayton. Ensuite, l'amine **4** est déprotégée en milieu acide et activé avec le thiocarbonyl diimidazole et couplé avec l'amine **5** pour donner le ligand final **6**.

Le faible rendement obtenu pour la dernière étape peut s'expliquer d'une part par la faible nucléophilie de l'amine aromatique **4** et d'autre part par l'encombrement stérique du motif biotinylé, qui rend la cinétique de la réaction lente. Par ailleurs, le motif biotinylé, très polaire, rend la purification délicate. L'analyse des sous-produits montre la présence de l'amine **4** déprotégée après purification de la dernière étape.

Des essais ont été réalisés pour synthétiser le ligand **6** à partir de l'amine **5** avec pour dernière étape le couplage du ligand avec la biotine. Cette voie de synthèse permet de

travailler avec des produits beaucoup moins polaires. Cependant, le couplage de la biotine avec le ligand n'a pas été observé. Le ligand **6** est obtenu pur après purification sur colonne chromatographique sur silice et pourra être testé dans la création de polymère de protéine.

2.2.3. Deuxième stratégie : synthèse d'un ligand organique tétra-biotinylé.

Cette synthèse a été réalisée dans le cadre d'un stage de 3^{ème} année par F. Monnard.^[230] Inspiré par les travaux de Stayton,^[228,229] la synthèse du ligand tétra-biotinylé **12** portant quatre biotines a été réalisée pour créer, en présence de (strept)avidine, un polymère dans lequel le ligand joue le rôle de connecteur. Ainsi, dans ce type de ligand, 2 motifs bis-biotinylés sont liés à l'aide d'un espaceur organique. Le ligand **12** présente deux intérêts majeurs (figure IV 2.6). D'une part, l'introduction d'un espaceur β -acide aminé entre la biotine et le motif central augmente l'écartement entre les deux motifs biotinylés, ce qui, par conséquent, apporte de la flexibilité à cette partie du ligand. D'autre part, par rapport au ligand **6**, la suppression du motif chélate et du métal résout les problèmes que peuvent poser la formation du complexe. Ce ligand est utilisable directement dans l'optique de créer des polymères coordonnés linéaires et, contrairement au ligand précédent, la géométrie est imposée par le ligand et n'est donc pas modulable.

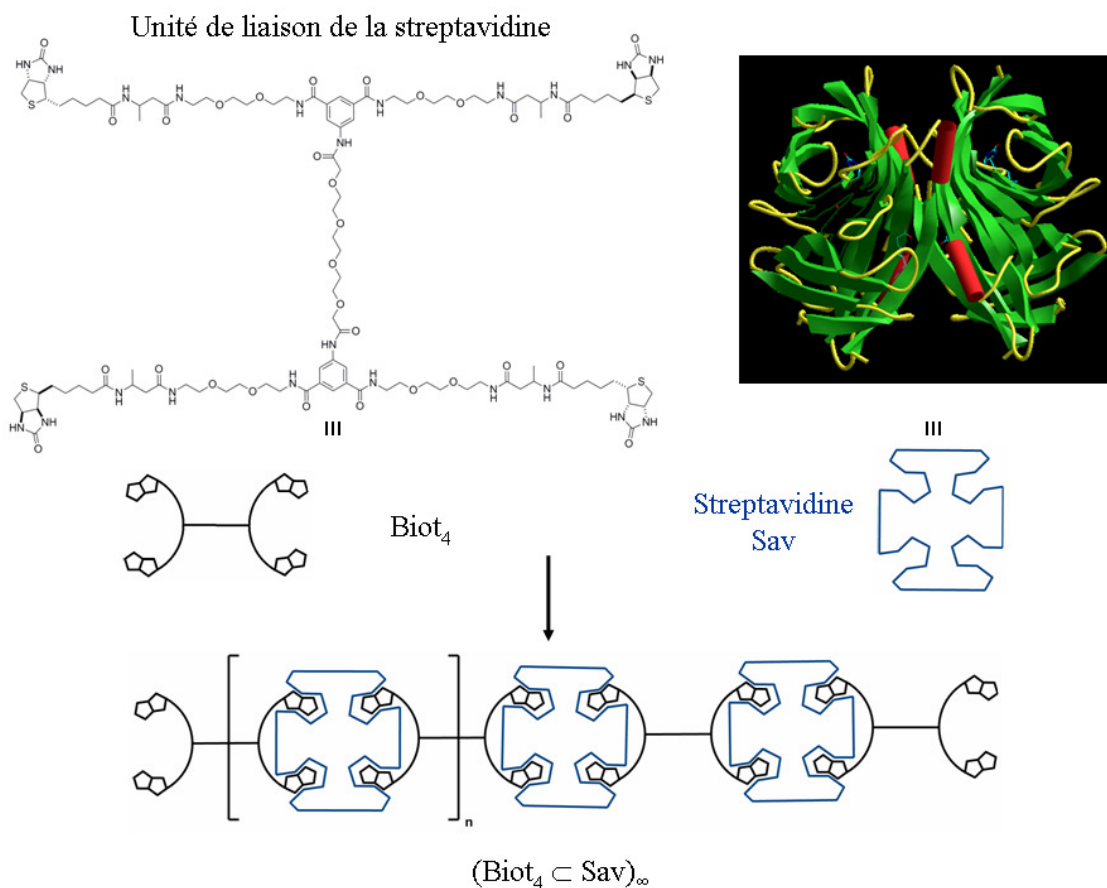


Figure IV 2.6. Représentation de la structure du ligand tétra-biotinylé **12** (en noir) qui en présence de streptavidine (en bleu) est supposé former un polymère linéaire (Biot₄ ⊂ Sav)_∞.

Cette molécule présente l'intérêt d'avoir de nombreuses possibilités d'être modifiée : soit en faisant varier la distance entre les deux biotines portées par le motif central aromatique, et ainsi permettre d'optimiser la fixation dans la protéine, soit en faisant varier la longueur de l'espaceur éthylène glycol qui se situe entre les deux motifs centraux, de façon à créer des polymères de protéine de différentes formes. De par son faible rendement, le couplage des deux motifs centraux bis-biotinylés est l'étape limitante de la synthèse (figure IV 2.7).

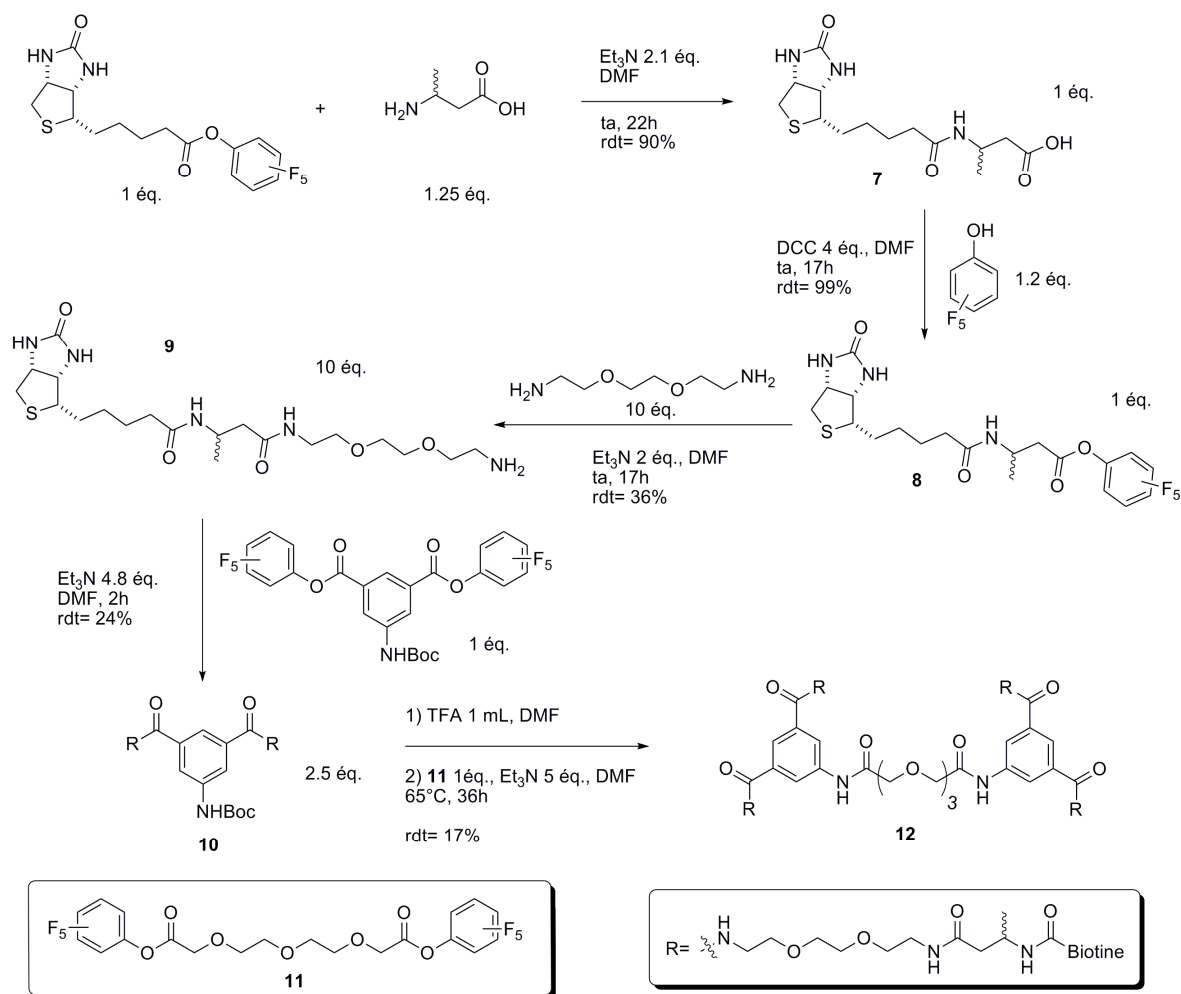


Figure IV 2.7. Synthèse du ligand tétra-biotinylé **12**.

La synthèse de l'amine **10** est réalisée suivant le protocole mis au point par Wilbur et al.^[231] Après déprotection en milieu acide, l'amine **10** est couplée au diacide activé **11** pour donner le ligand final **12**. La faible nucléophilie de l'amine aromatique **10**, d'autant plus désactivée par la présence de deux groupements esters électroattacteurs, est le premier facteur expliquant les modestes rendements.

D'autre part, l'introduction du motif biotinylé très polaire dès la première étape, rend les purifications difficiles. La réaction est effectuée à 65°C pendant 36 h.

Le composé **12** est obtenu pur après une séparation sur colonne chromatographique sur silice. Il pourra être utilisé pour les réactions de polymérisation avec la protéine.

Les ligands nécessaires à la réalisation de polymère de streptavidine étant synthétisés, les conditions de polymérisation peuvent être systématiquement testées afin de cerner le potentiel de ce nouveau type de construction.

2.3 Formation et caractérisation du polymère de protéine en microscopie à force atomique (AFM).

Nous disposons désormais de 3 ligands capables de s'ancrer dans la (strept)avidine de façon à former des polymères coordonnés. La visualisation du polymère de protéine nécessite le choix d'un support pour les échantillons, l'optimisation du temps de réaction entre la protéine et le ligand, et la mise au point des conditions de préparation des échantillons (concentration du dépôt de protéine et temps d'adsorption du polymère sur le support).

Seulement, les ligands **2** et **6** ont été testés en AFM. Il existe plusieurs modes pour imager des échantillons en AFM. Pour toutes les expériences réalisées avec cette technique de microscopie, seul le mode « tapping » a été utilisé. Il est de loin le plus précis. Dans ce mode, la pointe oscille suivant l'axe z pendant le balayage de l'échantillon (voir chapitre I 4.2.1).

2.3.1. Mise en place des conditions de polymérisation de protéine.

2.3.1.1. Préparations des solutions de protéine en présence des ligands 2 et 6.

Dans les expériences de microscopie réalisées, la streptavidine WT (« *wild type* » ou *type sauvage*) a été employée comme protéine de référence. Elle est solubilisée dans de l'eau milliQ à une concentration finale en tétramère de 0.01 mM. Les deux ligands sont solubilisés dans un solvant organique, le méthanol. La proportion de solvant organique par rapport à l'eau milliQ est inférieure à 10% pour éviter la dénaturation de la protéine. Les deux solutions sont alors mélangées et la solution résultante est agitée pendant 24 h.

2.3.1.2. Préparations des plaques d'analyse pour la microscopie.

Pour l'analyse des échantillons de protéines en AFM, il est nécessaire d'utiliser un support. Il y a deux raisons qui rendent le choix du support important. D'une part, la surface du support doit pouvoir fixer le polymère de protéine et d'autre part elle doit être assez plane pour pouvoir mesurer la topographie du polymère de protéine. Des plaques de silicium et de verre ont été utilisées comme support pour déposer l'échantillon de protéines. La protéine peut être représentée par un cube de 5 nm d'arête. Les plaques de silicium et de verre ont sur leurs surfaces des petites aspérités de l'ordre du nanomètre, qui peuvent gêner l'interprétation des résultats. Pour éviter ce phénomène, il a été nécessaire de préparer ces plaques. Dans un premier temps, les plaques sont lavées dans un mélange d'acide sulfurique et d'eau oxygénée pendant 10 min à 120°C. Ensuite, les plaques sont rincées avec de l'eau milliQ pendant 5min. Enfin, une fine couche de polystyrène est déposée par « spin-coating ». Des images en AFM

ont été réalisées pour vérifier que le protocole de préparations des plaques mis en place donne une surface assez plane pour la suite des expériences. (Figure IV 2.8)

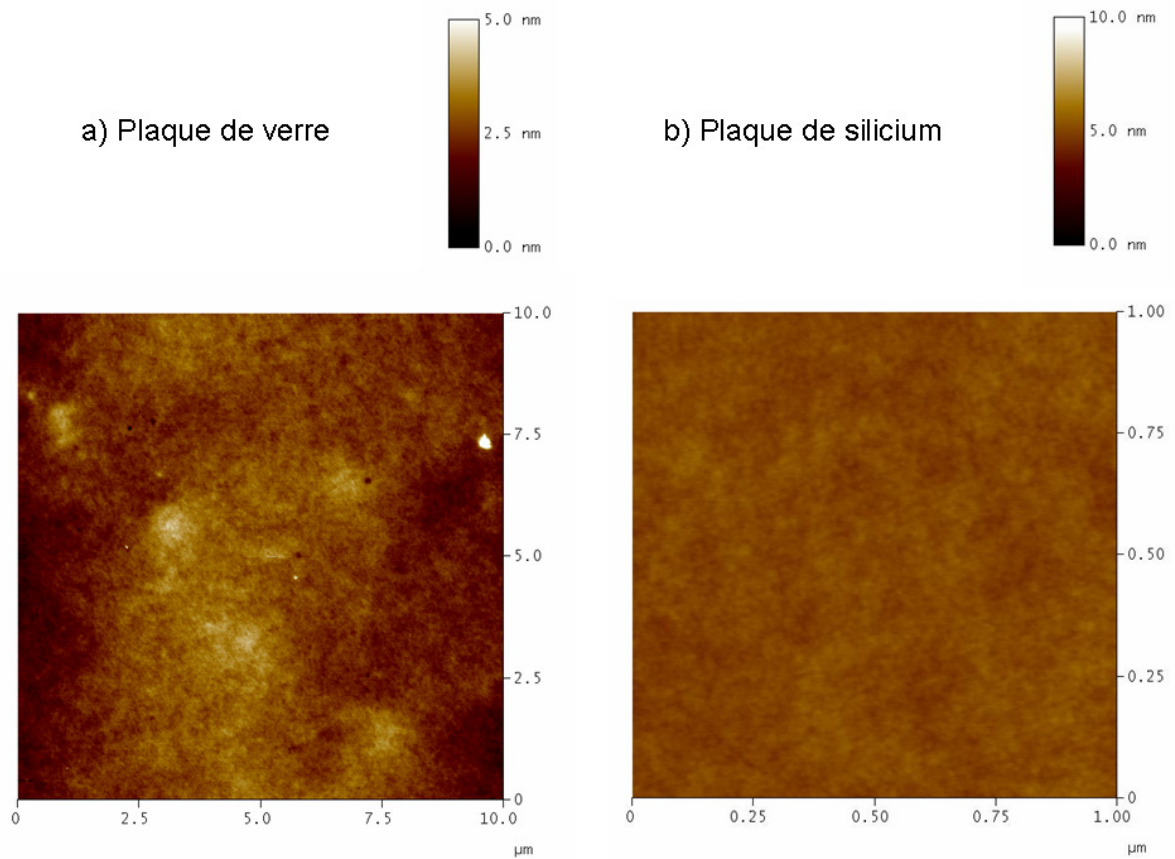


Figure IV 2.8. Expériences AFM montrant a) une plaque de verre recouvert d'une couche de polystyrène et b) une plaque de silicium recouvert d'une couche de polystyrène.

Les images sont représentées en dégradé de couleurs (foncé = bas et clair = haut). Dans le cas des deux supports de silicium et de verre, les images AFM montrent une surface assez plane, qui peut être utilisée pour la suite des expériences.

2.3.2. Résultats des expériences réalisées en AFM.

Une fois le choix du support effectué pour les expériences AFM, les expériences pour la visualisation du polymère de protéine ont pu être réalisées pour le ligand **2** et le complexe $[\text{Ag}(\mathbf{6})_2]^+$. Dans un premier temps, il est nécessaire de s'assurer que les polymères de protéine sont adsorbés sur les plaques utilisées dans les conditions choisies.

2.3.2.1. Adsorption de la streptavidine sur une plaque de silicium.

Le but de cette première expérience a été de mettre en évidence l'adsorption de la protéine sans ligand sur le support utilisé. Un volume de 50 μL de la solution de protéine est déposé sur une plaque de silicium préalablement traitée. La concentration de la solution en protéine tétramérique est de 1 μM . La goutte est laissée en contact avec la surface pendant 5 min. Le résultat est présenté dans la figure IV 2.9.

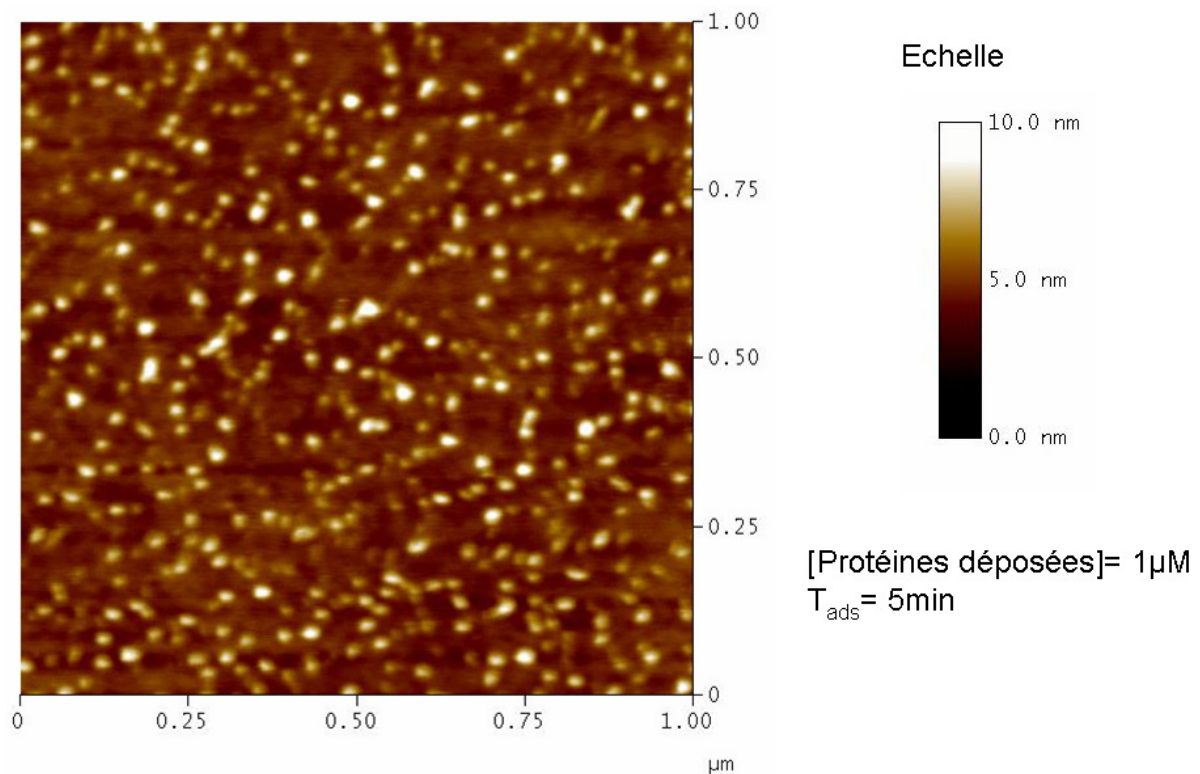


Figure IV 2.9. Expérience AFM montrant de la streptavidine adsorbée sur une plaque de silicium recouverte d'un polymère de polystyrène.

L'image prise en AFM correspond à la topographie de la surface d'une plaque sur laquelle la protéine a été déposée. A la différence de l'image prise sans la protéine (figure IV 2.8), on remarque la présence de nombreux points jaunes. L'épaisseur de ces points est de 5 nm. Elle correspond à la taille attendue pour celle d'une protéine. En revanche, la surface que ces points représentent est un peu supérieure à celle attendue pour une protéine. En effet, la surface attendue est la représentation d'un carré de 5 nm de côté alors que l'on observe des carrés d'une vingtaine de nanomètres de côté. Il y a deux explications à ce phénomène. D'une part, la résolution horizontale du microscope dépend du rayon de courbure de la pointe. Plus le rayon de courbure est petit, meilleure est la résolution. D'autre part, il n'est pas exclu que la protéine prenne une conformation plus plane sur la surface, dû aux interactions hydrophobes.

Aucune structuration n'est observée, les protéines sont réparties de façon aléatoire sur toute la surface de la plaque de silicium. Il semble aussi que les conditions choisies pour cette expérience (dilution et temps d'adsorption de la protéine) soient compatibles avec une bonne visualisation de la protéine sur la surface.

2.3.2.2. *Expérience du « scratch ».*

Cette expérience permet de pouvoir évaluer l'épaisseur de la couche de polystyrène déposée sur la plaque. Elle permet aussi de vérifier la quantité de protéine déposée sur la surface.

Pour la formation du polymère de protéine, le ligand **2** a été mélangé avec la streptavidine avec un rapport de 20 pour 1 en faveur du ligand, avec une concentration en protéine tétramérique de 10 μM . La solution est agitée pendant 24 h. Au bout de quelques heures, la solution devient turbide. Ce phénomène visuel peut s'expliquer par l'apparition de macrostructures insolubles. Enfin, la solution est diluée afin d'obtenir une concentration en protéine de 1 μM . Afin de pouvoir évaluer la couche de protéine déposée sur la surface, deux échantillons sont préparés. Le premier échantillon est une plaque de silicium avec une couche de polystyrène déposée à la surface. Le deuxième échantillon est une plaque de silicium avec une couche de polystyrène déposée à la surface sur lequel un volume de 50 μL de la solution de polymère de protéine a été déposé. Pour cette expérience, la goutte est laissée en contact avec la plaque pendant 15 min. Le résultat de l'expérience est présenté dans la figure IV 2.10.

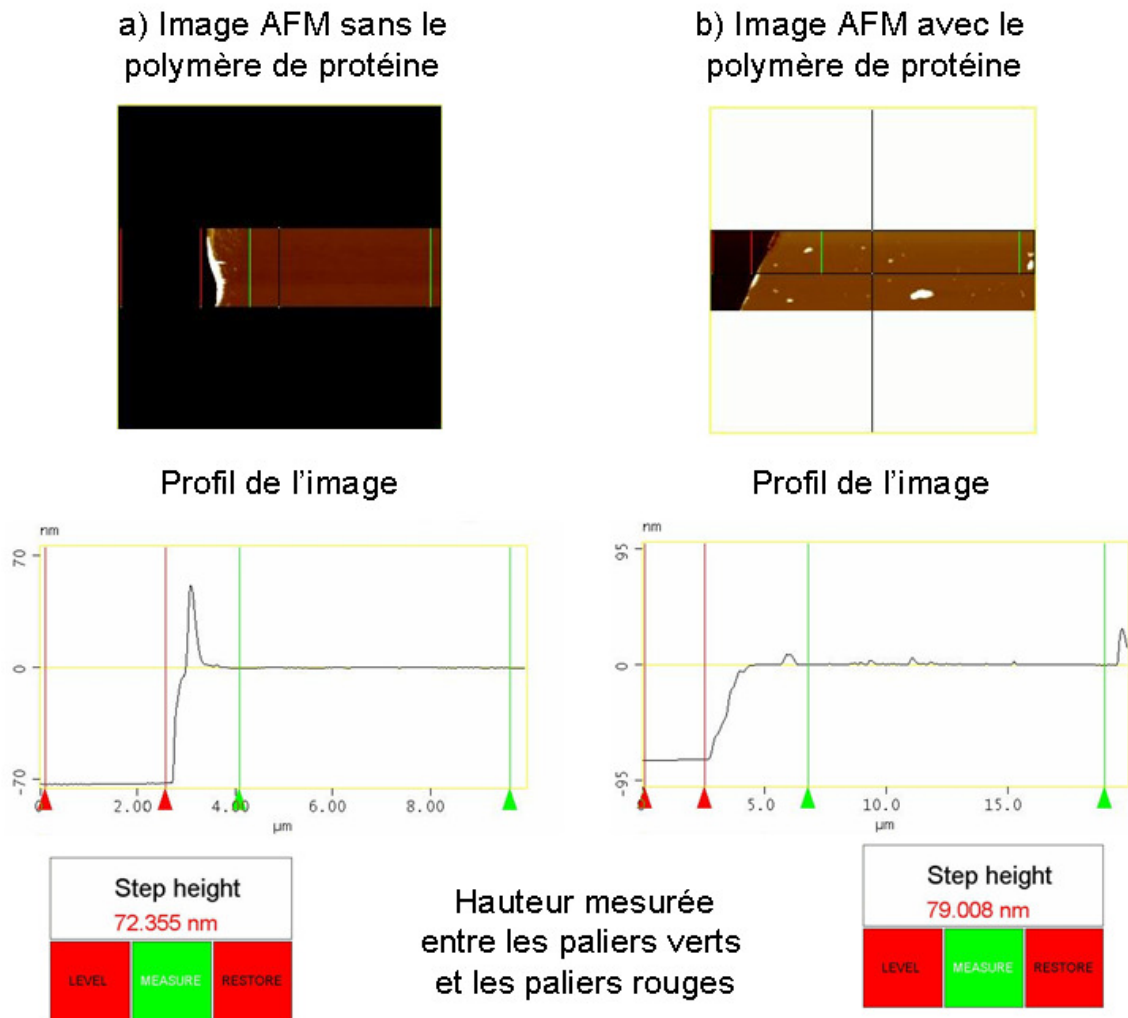


Figure IV 2.10. Expérience du « scratch » : a) l'image AFM sans polymère de protéines et b) l'image AFM avec polymère de protéines.

Pour l'expérience a), on observe une épaisseur de 72 nm. Cette épaisseur correspond au polystyrène déposé sur la plaque, pour la rendre plus plane. Pour l'expérience b), on observe une épaisseur de 79 nm. Cette épaisseur correspond au polystyrène déposé sur la plaque et la protéine adsorbée dessus, ce qui signifie que, dans ces conditions (dilution et temps d'adsorption), il y a une épaisseur de 5 nm de protéines adsorbées sur la plaque. Cette épaisseur correspond à une monocouche de protéines.

Ces expériences montrent que la streptavidine est adsorbée en monocouche sur les plaques de silicium en présence ou en absence de ligand.

Les différents paramètres de polymérisation de protéines étant définis (support utilisé, temps de réaction et temps d'adsorption), la visualisation de polymères en AFM peut-être effectuée en présence des ligands **2** et **6**.

2.3.2.3. Adsorption d'un polymère de streptavidine en présence du ligand 2.

Le ligand **2** est le premier ligand à avoir été testé en AFM. Sa structure simple permet une polymérisation plus facile.

Le ligand **2** est mélangé avec la streptavidine avec un rapport 20 pour 1 en faveur du ligand et une concentration en protéine tétramérique de 10 μM . La solution est agitée pendant 24 h. Au bout de quelques heures, la solution devient turbide. Pour la préparation de l'échantillon en microscopie AFM, la solution de protéine est diluée. La concentration en protéine est alors de 1 μM . Un volume de 50 μL de la solution est déposé sur une plaque de verre. Cette goutte est laissée sur la plaque pendant 1 h, pour s'assurer de l'adsorption de la protéine sur la surface. L'excès de la solution est absorbé à l'aide de papier absorbant sans fibre et la plaque est séchée à l'aide d'un flux d'azote. Le résultat mesuré en AFM est présenté dans la figure IV 2.11.

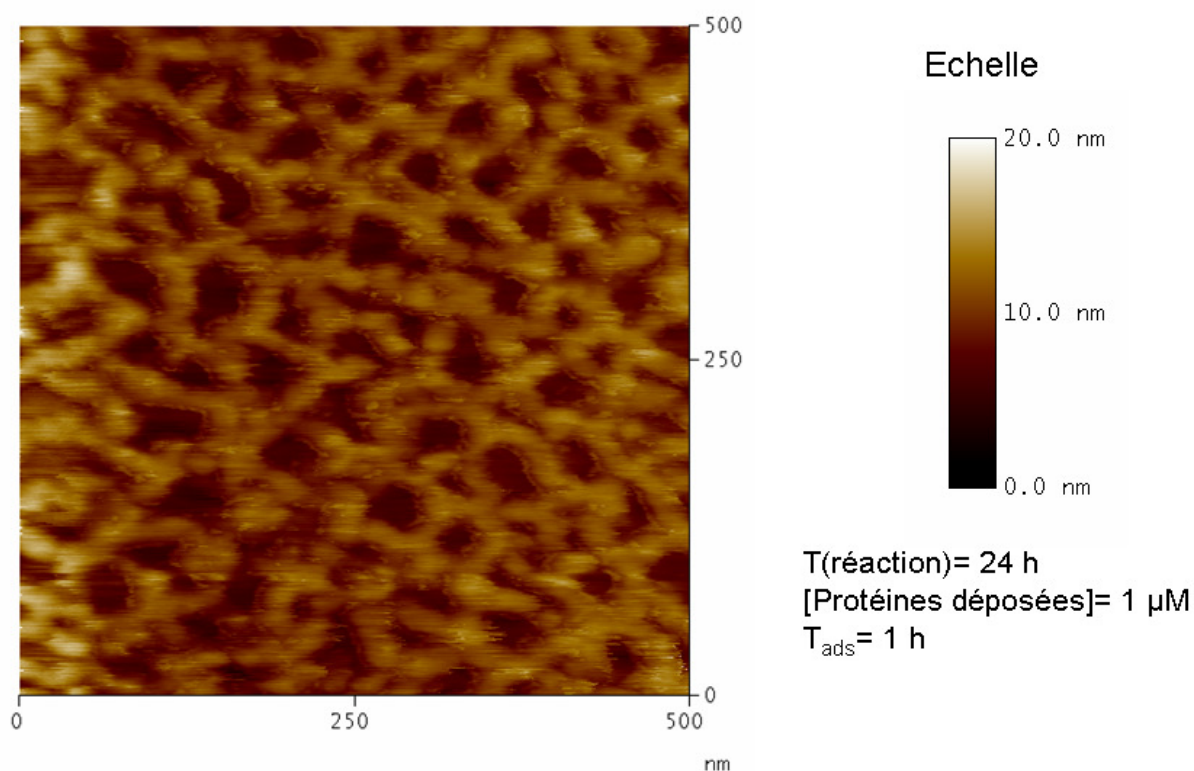


Figure IV 2.11. Image AFM représentant un polymère de streptavidine en présence du ligand **2**.

En comparaison avec la figure IV 2.9, qui a été faite avec uniquement de la streptavidine, l'image réalisée avec le ligand **2** montre une certaine structuration. En effet, on remarque la présence de nombreuses connections entre les différents monomères de la protéine. Plusieurs images ont été réalisées avec la même solution et à chaque fois le même résultat a été observé. On obtient une structure du polymère en forme de « nids d'abeille ». Cependant, la structuration du polymère de protéine ne se fait pas parfaitement. Le ligand possède trois biotines donc il n'est pas possible de saturer entièrement avec un seul ligand les sites actifs de la protéine, ce qui explique les irrégularités observés sur les images prises en AFM.

Les échantillons contenant des protéines sont difficiles à analyser par AFM, car la présence de protéines engendre une destruction rapide de la pointe ; celle-ci doit être changée après seulement quelques balayages de l'échantillon.

De plus, la largeur des structures observées est plus grande que la taille d'une seule protéine. Ce phénomène peut s'expliquer par l'aggrégation de plusieurs protéines, qui sont liées soit par le ligand biotinylé soit par interactions hydrophobes.

La polymérisation de la streptavidine en présence du ligand **2** a été reproduite plusieurs fois et le même type d'image a été obtenu pour tous les essais. Dans ces conditions de réaction et de dilution, plusieurs autres temps d'adsorption plus courts ont été testés, aucune différence n'a pu être observée.

2.3.2.4. Adsorption d'un polymère de streptavidine en présence du ligand 6.

Le ligand **2** a permis la mise au point de conditions qui permettent la visualisation du polymère de protéines. L'utilisation du ligand **6** devrait permettre une polymérisation contrôlée de la protéine. En effet, ce ligand a été synthétisé dans le but d'obtenir un polymère linéaire. Pour cela, comme décrit dans la figure IV 2.4, il est nécessaire de former le complexe $[\text{Ag}(\mathbf{6})_2]^+$, par traitement du ligand **6** avec un sel d'argent. Le trifluoro acétate d'argent (I) a été pris comme précurseur métallique. Ensuite, le polymère est formé par addition de la streptavidine dans un rapport $S_{av} / [\text{Ag}(\mathbf{6})_2]^+ = 1 / 2$.

La préparation de la plaque et de l'échantillon est le même pour le ligand **2**. Un volume de 50 μL de solution est déposé sur une plaque de silicium (préalablement recouvert d'une couche de polystyrène). La solution est laissée pendant 5 min en contact avec la surface, pour permettre au polymère de se déposer sur la surface. L'excès de la goutte est absorbé avec du papier absorbant sans fibre et la plaque est séchée sous un flux d'azote.

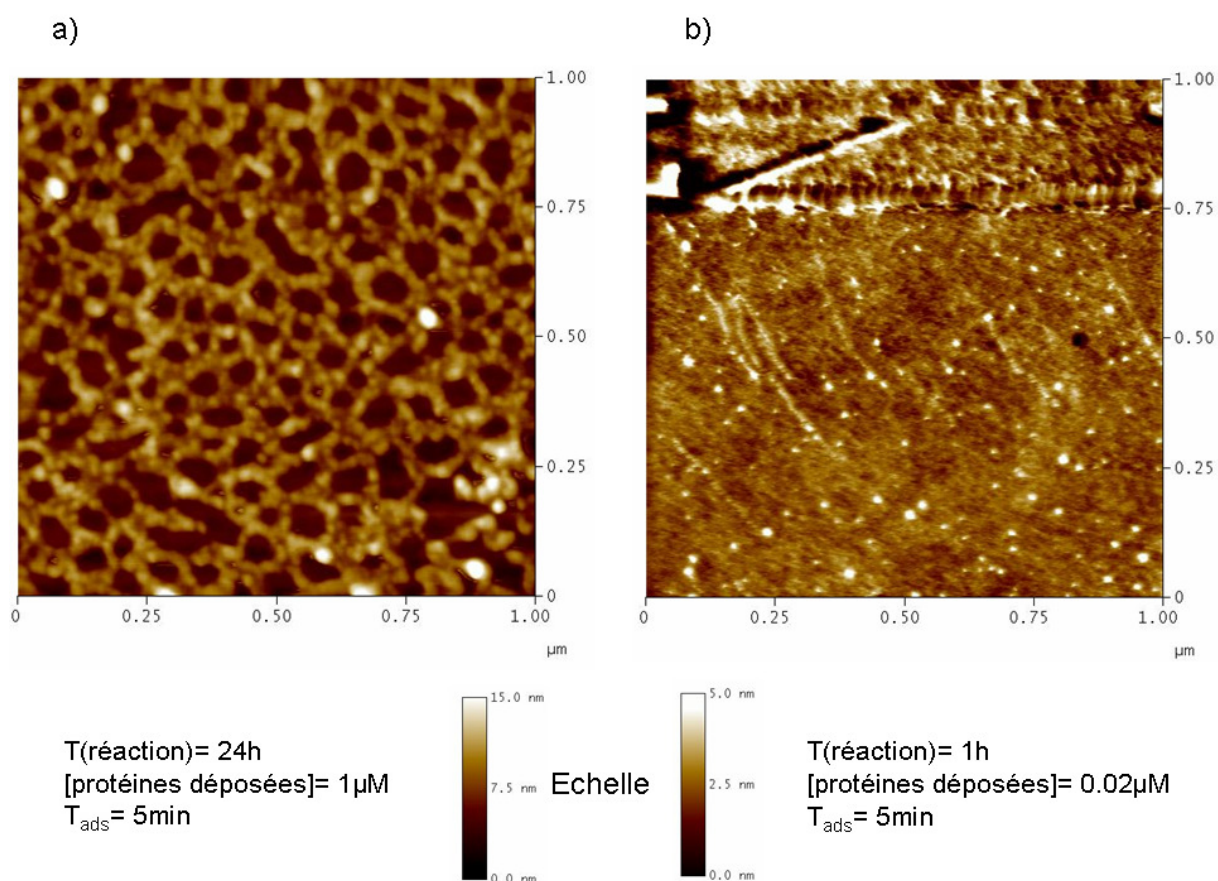


Figure IV 2.12. Images AFM représentant un polymère de streptavidine en présence du complexe $[\text{Ag}(\mathbf{6})_2]^+$ avec des concentrations différentes de protéines déposées sur la surface : a) $[\text{Sav}] = 1\mu\text{M}$; b) $[\text{Sav}] = 0.26\mu\text{M}$.

Deux différentes conditions opératoires ont été utilisées pour la polymérisation avec le ligand **6** et la figure IV 2.12 montre deux images représentatives obtenues dans les 2 cas : temps de réaction 24 h et solution de protéine déposée sur la plaque à $1\mu\text{M}$ (figure IV 2.12 a)) ; temps de réaction 1 h et solution de protéine déposée sur la plaque à $0.02\mu\text{M}$ (figure IV 2.12 b)). Les autres paramètres de l'expérience sont identiques.

Dans le premier cas, la solution contenant le ligand et la streptavidine devient turbide après quelques heures d'agitation, comme dans le cas du ligand **2** (voir paragraphe 2.3.2.3). Dans le deuxième cas, qui implique un temps de réaction plus court et une concentration plus faible de la streptavidine, la turbidité n'apparaît pas.

Les images obtenues sont différentes pour les deux cas. Pour l'image a), on observe une polymérisation en « nids d'abeille ». Ce résultat est similaire aux images obtenues avec le ligand **2**. Pour l'image b), on observe la présence de lignes qui correspondent à une polymérisation linéaire de la protéine avec le complexe $[\text{Ag}(\mathbf{6})_2]^+$.

Ces résultats peuvent s'expliquer par la concentration plus faible et le temps de réaction plus court employé dans le deuxième cas. Le temps de réaction plus court joue un rôle sur le degré de polymérisation. La concentration joue un rôle dans les interactions hydrophobes entre les protéines.

Plusieurs tentatives d'obtenir le polymère linéaire ont été réalisées avec des concentrations plus faibles en protéine, mais sans obtenir des résultats concluants.

2.3.2.5. Conclusions des expériences AFM.

Les différentes expériences réalisées en AFM montrent que la polymérisation de protéines est possible. La construction d'un réseau bi-dimensionnel a été rendue possible pour le ligand **2**. Pour le ligand **6**, une expérience a montré le polymère de protéine linéaire attendu. Cependant, cette technique de microscopie a montré un certain nombre de limitations. En effet, la taille des protéines (5 nm) se situe à la limite de visualisation de l'AFM. La visualisation est d'autant plus difficile si l'on travaille dans un milieu fortement dilué. De plus, cette technique n'apporte qu'une information sur la topographie de la surface et ne donne aucune information sur la nature du polymère. Il est impossible de déterminer par cette technique la présence de l'atome d'argent. Enfin, il est difficile de reproduire les résultats obtenus dû au fait de nombreuses contraintes expérimentales telles que la qualité de la pointe, la préparation des plaques ou la préparation de l'échantillon. La difficulté de reproductibilité des résultats obtenus avec le complexe $[\text{Ag}(\mathbf{6})_2]^+$ a conduit à la synthèse du ligand **12**.

2.3.3. Formation et caractérisation du polymère de protéine en microscopie électronique à balayage (MEB).

Une série d'expériences a été réalisée avec la streptavidine et le complexe $[\text{Ag}(\mathbf{6})_2]^+$ avec le MEB pour confirmer le résultat obtenu avec l'AFM.

Pour cette expérience, le ligand **6** est mélangé avec un sel de sulfate d'argent (I) dans un rapport 4 pour 1 en faveur du ligand, pour former le complexe $[\text{Ag}(\mathbf{6})_2]^+$. Ensuite, le complexe est mis en présence de la streptavidine dans un rapport 1 pour 1. La solution est agitée pendant 5 min. 60 μL de la solution sont prélevés et déposés sur le plot de carbone. La concentration de la protéine pour ces échantillons est de 8 μM . La goutte d'eau est laissée évaporer sans en enlever l'excès. Une fois que le plot de carbone est sec, la surface de celui-ci est recouverte d'une fine couche d'or afin de rendre la surface conductrice. Les résultats obtenus en MEB sont présentés dans la figure IV 2.13.

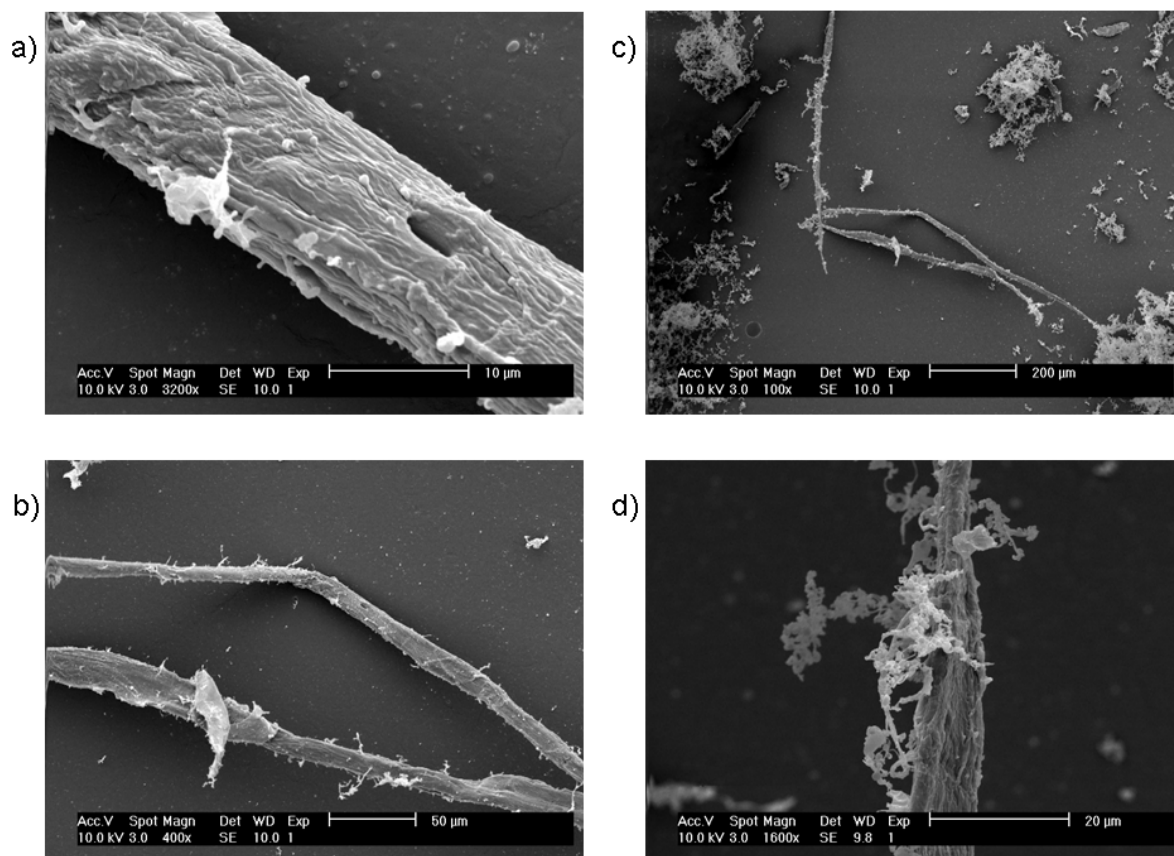


Figure IV 2.13. Images MEB (ou SEM) (a), b), c) et d)) représentant un polymère de streptavidine en présence du ligand **6** réalisées sur un même échantillon.

Les quatre images présentées dans la figure II 2.12 ont été réalisées sur le même échantillon. D'après les images obtenues en MEB, le polymère linéaire de streptavidine semble bien se former et confirme le résultat obtenu avec l'AFM. Cependant, la taille du polymère observé avec le MEB est différente de celui obtenu avec l'AFM. En effet, le polymère a une longueur de plusieurs microns et une épaisseur de 10 µM. Cela indique que, comme dans le cas du collagène,^[232] plusieurs polymères de protéines sont associés par des interactions hydrophobes. Le nombre d'expériences réalisées avec le MEB étant restreint, il n'a pas été possible de tirer plus de conclusions sur cette expérience.

3. Conclusion.

Dans cette étude, la synthèse de trois nouveaux ligands a été réalisée dans le but d'étudier la formation de polymères de streptavidine.

La caractérisation des nouvelles structures a été faite en utilisant deux méthodes de microscopie : l'AFM et le MEB (ou SEM) ; de nombreux tests sur la préparation des plaques et des échantillons ont permis d'obtenir des images de protéine fixée sur le support. La formation d'un polymère de streptavidine avec une structure en « nids d'abeilles » a été observée en AFM, en utilisant un ligand de type tris-biotinylé. Pour obtenir des polymères linéaires, un ligand bis-biotinylé contenant un groupement chélate de type pyridine a été employé en combinaison avec l'argent. Dans des conditions de concentration faible en protéine, un polymère linéaire de streptavidine a été observé en AFM. Ce résultat a été confirmé en utilisant le MEB comme technique de visualisation ; cependant, la largeur du polymère visualisé par MEB est beaucoup plus importante.

Un troisième ligand contenant 2 motifs bis-biotinylés a été synthétisé, mais il n'a pas été utilisé pour la formation de polymère de streptavidine. Jusqu'à ce jour aucune expérience n'a été réalisée en microscopie électronique à transmission (TEM). Cette technique pourrait être testée dans le futur avec les conditions de polymérisation utilisées dans le cas de l'image obtenue en AFM avec le complexe $[Ag(6)_2]^+$. La création de polymères de streptavidine est à son début et il reste encore de nombreuses expériences complémentaires à réaliser pour confirmer les premiers résultats obtenus en microscopie.

Des tests sont réalisés actuellement au laboratoire par Mme Sabina Burazerovic.

Chapitre V : Conclusion générale et perspectives.

Cette étude a permis de développer de nouvelles applications des complexes métalliques en catalyse homogène, avec des enzymes artificielles et en nanotechnologie.

Dans une première partie du travail, plusieurs complexes ruthénium-diphosphine ont été testés pour l'hydrogénation asymétrique du 4-chloro-3-oxobutanoate d'éthyle et de l'ester d'éthyle de la carnitone dans le but d'obtenir une bonne activité et énantiosélectivité dans des conditions de réactions douces.

Pour ce projet, plus de 800 catalyses ont été réalisées et ont permis de tester de nombreux paramètres comme les ligands diphosphines, les précurseurs métalliques, les additifs, la pression d'hydrogène et la température. Pour l'hydrogénation du CAAEt, nous avons obtenu un excès énantiomérique de 95% avec le ligand Cy-soniphos. Ce résultat a été obtenu dans des conditions de température et de pression d'hydrogène dites « douces » (60°C et 50 bars d'hydrogène). Pour l'hydrogénation de l'ester d'éthyle de la carnitone, un excès énantiomérique de 95% a été obtenu avec le ligand difluorophos.

Dans des travaux futurs, il pourrait être intéressant de tester les ligands donnant les meilleurs excès énantiomériques avec les meilleures conditions (additifs et solvants). Concernant l'ester d'éthyl de la carnitone, il pourrait être intéressant de poursuivre les recherches en augmentant le rapport substrat sur catalyseur dans l'optique d'une application industrielle pour la production de la carnitine optiquement pure.

Concernant les catalyseurs hybrides, une nouvelle génération a été développée pour la réaction d'alkylation allylique asymétrique, réaction qui n'a pas d'équivalent dans la nature.^[233] En combinant 22 protéines avec 14 complexes biotinylés, une librairie de plus de 300 catalyseurs a été étudiée pour l'alkylation allylique asymétrique de l'acétate de 1,3-

diphényl-2-propanol. Nous avons obtenus des excès énantiomérique de 90% en faveur de l'énantiomères (*R*) avec le complexe $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-4}^o\text{-1}]^+ \subset \text{S112A}$ et de 82% en faveur de l'énantiomère (*S*) avec le complexe $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biot-(R)-Pro-1}]^+ \subset \text{S112G-V47G}$. Ces résultats ont été obtenus après une évolution chimio-génétique.

De plus, pour la première fois avec le système des métalloenzymes artificielles, des expériences de dichroïsme circulaire réalisées avec des complexes biotinylés du palladium incorporés dans la streptavidine ont montré que l'environnement autour du complexe est chiral. Ces expériences et l'analyse de la streptavidine par gels d'électrophorèse ont montré que la protéine reste active même soumise à des conditions de catalyses dures (pH élevé et présence d'un surfactant).

Pour mieux comprendre le fonctionnement de ces métalloenzymes artificielles, l'investigation du site catalytique pourrait être poursuivie, notamment en étudiant l'effet des diverses mutations, par exemple dans le loop 7-8, situé dans la proximité du site catalytique.

De plus, la cristallisation des métalloenzymes artificielles pourrait fournir un grand nombre d'informations sur l'environnement chiral du complexe.

Ayant établi les bases du système, il pourrait être intéressant de tester d'autres substrats plus fonctionnalisés. L'augmentation de la température pourrait être une voie à tester dans l'optique d'utiliser des substrats moins réactifs. La plupart de ces études sont d'ores et déjà en cours dans le groupe.

La dernière partie du travail concerne l'application des complexes métalliques en nanotechnologie. La synthèse d'un ligand bis-biotinylé possédant une fonction chélate de type pyridine a été réalisée. En présence d'un métal tel que l'argent, un complexe métallique possédant 4 groupements biotines peut être formé. Lors de l'ajout de la streptavidine, un polymère se forme. Nous avons observé la formation du polymère de protéine avec deux techniques de microscopie différente (AFM et MEB). De plus, nous avons réalisé la synthèse

de deux autres ligands purement organiques afin de varier les macrostructures des polymères de protéine. Ainsi, nous avons observé en AFM la formation d'un polymère de protéine en « nids d'abeille » avec un ligand tris-biotinylé.

Ayant obtenu ces premiers résultats encourageants, il pourrait être intéressant de synthétiser de nouveaux ligands contenant des motifs terminaux tels que bipyridine ou terpyridine. D'autres ligands et d'autres complexes ont d'ores et déjà été synthétisés et caractérisés en microscopie.^[234] Enfin, la caractérisation des polymères de protéines pourrait être réalisée avec d'autres méthodes comme la microscopie électronique à transmission (TEM).

Chapitre VI : Matériel et Méthodes.

Cette partie décrit l'essentiel des abréviations utilisées ainsi que le détail des synthèses et analyses réalisées au cours de ces travaux. Les appareils, les solvants et les techniques employées sont également détaillés.

1. Abréviations et Glossaire.

⊂ :	Inclus dans
Å :	Angström
AcOEt :	Acétate d'éthyle
AFM :	Microscopie à force atomique
Avi :	Avidine
CD :	Dichroïsme circulaire
Conv. :	Conversion
DCM :	Dichlorométhane
DMF :	<i>N,N'</i> -Diméthylformamide
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
ee :	Excès énantiomérique
EN :	Ethylène diamine
éq. :	Equivalent
Et :	Ethyle
EtOH :	Ethanol

GC :	Chromatographie en phase gazeuse
Hz :	Hertz
HPLC :	Chromatographie en phase liquide
M :	Molaire ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Me :	Méthyle
MEB :	Microscopie électronique à balayage
min :	Minute
Rdt :	Rendement
RT (ou TA) :	Température ambiante (Room temperature)
Sav :	Streptavidine
t :	Temps en heures (h.) ou en minutes (min.)
T°C :	Température en degré Celsius
TEM :	Microscopie électronique par transmission
THF :	Tétrahydrofurane
<i>t</i> Bu :	<i>tert</i> -butyle
TFA :	Acide trifluoroacétique
UV :	Ultraviolet
<i>vs.</i> :	Versus
WT :	Type sauvage (Wild type)

2. Appareillages.

2.1. Dichroïsme circulaire : CD.

Les spectres CD sont enregistrés avec un spectropolarimètre JASCO 710. Les échantillons sont préparés avec de l'eau milliQ dans des cuves toutes en quartz. Les données sont traitées avec Excel.

2.2. Résonance magnétique nucléaire : RMN (NMR).

Les spectres ^{13}C , ^1H sont réalisés avec un spectromètre 400 MHz (Bruker) ou à 200 MHz (Varian). Les solvants deutérés utilisés sont le chloroforme (99.8% D), le DMSO (99.5% D) ou le méthanol (99.8% D) (Cambridge Isotope Laboratories). Pour l'analyse des spectres est noté : s pour singulet, d pour doublet, t pour triplet, m pour multiplet et br pour large (broad).

2.3. Chromatographie liquide : HPLC.

Les spectres et analyses sont réalisés avec un appareil HPLC HP-1100 muni d'un détecteur UV-Visible et d'un auto-échantillonneur de 100 places. Les solvants utilisés sont de qualité puriss (GC-HPLC grade). La colonne chirale utilisée est le IA-H (Daicel Chemical Industries, Tokyo).

2.4. Chromatographie gazeuse : GC.

Les spectres et analyses sont réalisés sur un appareil GC HP 5890 avec la colonne Lipodex-E (25 m x 0.25 mm). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur. Les conditions de température et les temps de rétentions de chaque produit sont détaillés dans la partie expérimentale.

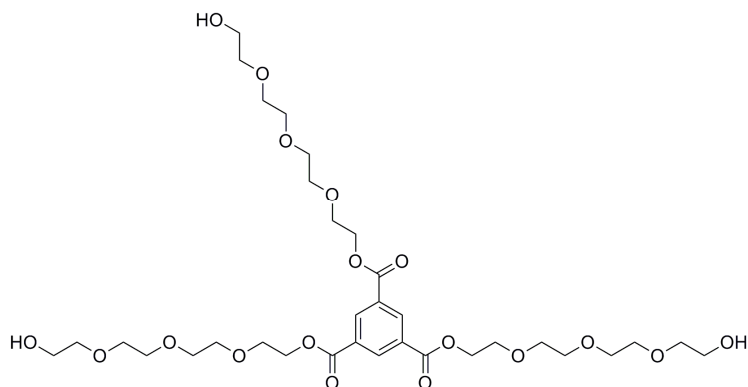
2.5. Spectrométrie de masse : MS.

Les analyses de masse sont réalisées à l'université de Fribourg avec un spectromètre FTMS et un mode de ionisation ESI (electron spray ionisation). Pour chaque analyse, l'intensité du signal est indiquée entre parenthèses.

3. Experimental procedure for the nanotechnology project.

3.1. Experimental procedure for the synthesis of 2.

3.1.1. tris(3,6,9,12-tetraoxaheptadecyl alcohol)-1,3,5- benzenetricarboxylate: 1.

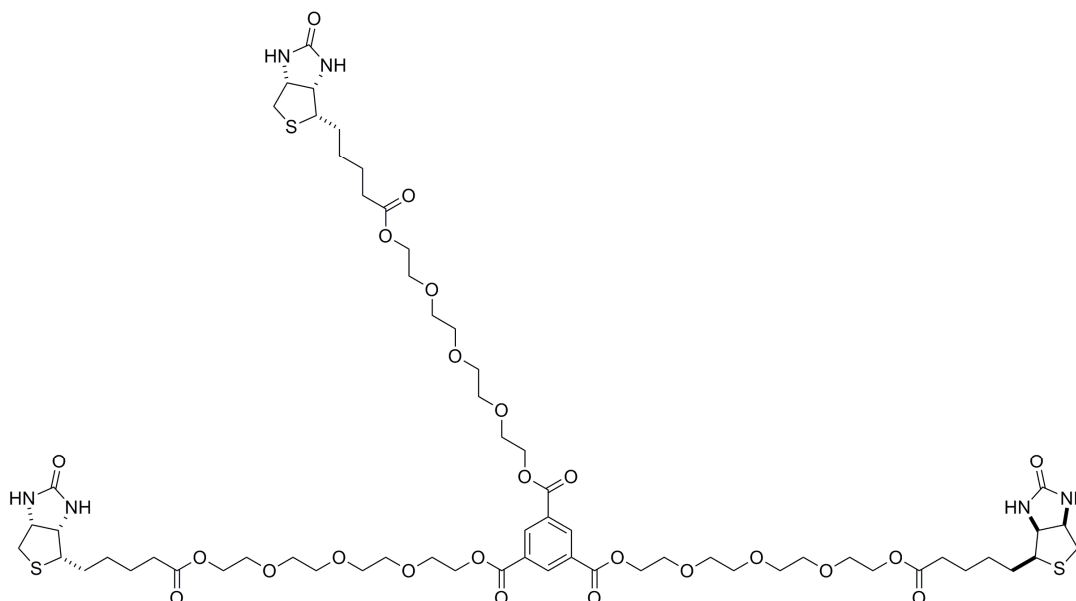


A CH_2Cl_2 solution (50 mL) containing 1,3,5-benzenetricarbonyl chloride (0.5g, 1.88 mmol, 1 eq.) was added dropwise over 1 h to a solution of tetraethylene glycol (3.29 g, 16.92 mmol, 9 eq.) and Et_3N (0.78 mL, 5.64 mmol, 3 eq.) in CH_2Cl_2 (150 mL). After stirring 72 h at RT, the solution was washed with water (3 x 30 mL), dried with MgSO_4 and the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography (Silicagel, CHCl_3 : MeOH (10 : 1)) to afford the pure product as a yellow oil (0.4g, 0.54 mmol, 29% yield).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 27°C): δ 3.61 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.70 (m, 30H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.85 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OC(O)}$), 4.50 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OC(O)}$), 8.96 (s, 3H, CH); ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 27°C): δ 62.0 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 65.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OC(O)}$), 69.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-$

OC(O)), 71.0-73.3 (CH₂-O), 131.5 (CH-C-CH), 135.2 (C-CH-C), 165.3 (CO); IR (KBr, cm⁻¹): 3426, 2872, 1726, 1613, 1579, 1445, 1352, 1301, 1244, 1104, 1033, 949, 864, 740, 720.

3.1.2. tris((biotin)-3,6,9,12-tetraoxaheptadecyl)benzene-1,3,5-tricarboxylate: **2**.



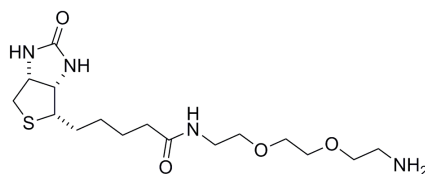
A DMF : CH₂Cl₂ (1 : 1) solution (5 mL) containing biotin pentafluorophenol (0.17 g, 0.41 mmol, 6 eq.)^[235] and Et₃N (0.056 mL, 0.41 mmol, 6 eq.) was added dropwise by a syringe to a solution of **1** (0.05 g, 0.07 mmol, 6 eq.) in CH₂Cl₂ (5 mL). The solution was stirred at RT overnight. The solution was washed with a solution of NaOH 2 M (2 x 20 mL), followed by water (3 x 20 mL), dried with MgSO₄ and the solvent was removed under vacuum. The crude product was dissolved in MeOH and ether was added to precipitate the product. After filtration, the final product was dried under reduce of pressure to afford a yellow powder (0.31 g, 0.21 mmol, 31% yield)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 27°C): δ 1.26-1.76 (m, 18H, CH₂), 2.35 (t, J= 7.5 Hz, 6H, CH₂-CH₂-CH₂-CO), 2.89 (m, 6H, CH-CH₂-S), 3.16 (m, 3H, S-CH-CH), 3.67 (m, 12H, CH₂-

CO), 3.99 (m, 24H, O-CH₂), 4.33 (m, 3H, CH-CH-S), 4.52 (m, 3H, CH-CH₂-S), 8.86 (s, 3H, CH); ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 27°C) δ 25.2, 28.6, 28.7, 34.1, 40.9, 52.0, 53.0, 55.8, 60.6, 62.3, 131.6, 135.0, 164.0, 165.8, 174.5; IR (cm⁻¹): 2923, 1744, 1731, 1709, 1626, 1463, 1322, 1305, 1287, 1248, 1170, 1015, 927; ESI-MS for C₆₃H₉₆N₆O₂₄S₃ : 708 (100) [M/2]²⁺.

3.2. Experimental procedure for the synthesis of 6.

3.2.1. N-Biotinyl-3,6-dioxaoctane-1,8-diamine: 3.

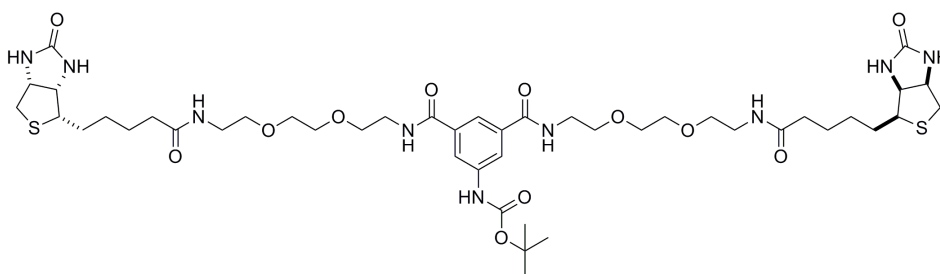


A DMF solution (100 mL) containing biotin pentafluorophenol (1 g, 2.44 mmol, 1 eq.) was added dropwise over 1 h to a solution of 3,6-dioxaoctane-1,8-diamine (7.22 g, 48.78 mmol, 20 eq.) in DMF (50 mL). The solution was stirred 24 h at RT. The solvent was removed under vacuum. Then the oil was triturated in ether (200 mL) and the resultant precipitate was filtrated. The crude product was purified by flash chromatography (Silicagel, MeOH : AcOEt (4 : 1)) to afford the pure product as a white solide (0.63 g, 1.69 mmol, 69% yield).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 27°C): δ 1.20-1.78 (m, 6H, CH₂), 2.23 (t, J= 7.4 Hz, 2H; CH₂-CH₂-CH₂-CO), 2.72 (d, J= 12.7 Hz, 1H; CH-CH₂-S), 2.82 (t, J= 5.3 Hz, 2H; CH₂-CH₂-NH₂), 2.94 (dd, J= 5.0 Hz, J= 12.7 Hz, 1H; CH-CH₂-S), 3.22 (m, 1H; S-CH-CH), 3.32 (m, 2H; NH-CH₂-CH₂-O), 3.55 (m, 4H; O-CH₂-CH₂-O), 3.64 (m, 4H; CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂),

4.33 (m, 1H; *CH-CH-S*), 4.51 (m, 1H; *CH-CH₂-S*); ¹³C NMR (100.6 MHz, CD₃OD, 27°C) δ 25.8, 28.5, 28.8, 35.7, 39.3, 40.0, 41.0, 56.0, 60.6, 62.4, 69.6, 70.3, 72.2, 165.1, 175.2; ESI-MS for C₁₆H₃₀N₄O₄S : 375 (100) [M+1]⁺.

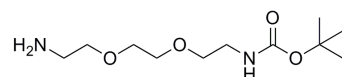
3.2.2. *N',N''*-Bis(8-biotinamido-3,6-dioxaoctanyl-1,8-diamino)-5-(*N-tert*-butyloxycarbonyl)aminoisophthalamide: **4**.



A DMF solution (20 mL) of *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-5-aminoisophthalate bis-pentafluorophenyl ester (0.18 g, 0.3 mmol, 1 eq.) was added dropwise over 1 h to a solution of **3** (0.63 g, 1.69 mmol, 5.6 eq.) and Et₃N (0.24 mL, 1.69 mmol, 5.6 eq.) in DMF (8 mL). The solution was stirred at RT overnight. The solvent was removed under vacuum. The crude product was dissolved in a minimal amount of MeOH. This solution was loaded onto a silicagel column and was eluted using AcOEt (400 mL) and then a MeOH : AcOEt mixture increasing the percentage of MeOH. The product eluted using a mixture of MeOH : AcOEt (2 : 3). The pure product was obtained as a colorless solid (0.39 g, 0.30 mmol, 97% yield).

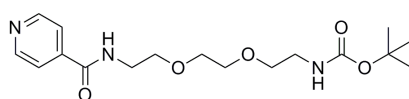
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, 27°C): δ 1.2-1.6 (m, 12H; CH₂), 1.4 (s, 9H; *t*Bu), 2.0 (t, J=7.4 Hz, 4H; CH₂), 2.5 (m, 2H; *CH-CH₂-S*), 2.8 (m, 2H; *CH-CH₂-S*), 3.0 (m, 2H, *S-CH-CH*), 3.2 (m, 8H; NH-*CH₂-CH₂-O*), 3.4 (m, 16H; *CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂*), 4.1 (m, 2H; *CH-CH-S*), 4.3 (m, 2H; *CH-CH₂-S*); ESI-MS for C₄₅H₇₁N₉O₁₂S₂ : 1016 (100) [M+Na]⁺.

3.2.3. *N*-(3,6-dioxaoctanyl-1,8-diamino) isonicotinamide: **5**.



A CH₂Cl₂ solution (25 mL) of di-*tert*-butyl dicarbonate (0.57 g, 2.61 mmol, 1 eq.) was added dropwise to a solution of 3,6-dioxaoctanyl-1,8-diamine in CH₂Cl₂ (15 mL). The solution was stirred 12 h at RT. The solvent was removed under vacuum. The crude product was dissolved in CHCl₃ (50 mL) and was washed with water (100 mL). The organic solution was dried with MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The pure product was obtained without purification as colourless oil (0.53 g, 2.15 mmol, 82% yield).

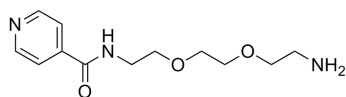
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 27°C) : δ 1.36 (s, 9H; *t*Bu), 1.44 (s, 2H; NH₂), 2.80 (m, 2H; NH₂-CH₂-CH₂), 3.22 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂), 3.44 (m, 4H; O-CH₂-CH₂-O), 3.54 (m, 4H; CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂), 5.24 (br s, 1H; NH); ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 27°C) : δ 28.7, 40.6, 42.0, 70.5, 73.7, 79.4, 156.4; APCI-MS for C₁₁H₂₄N₂O₄ : 249.0 (100) [M+1]⁺.



A CH₂Cl₂ solution (50 mL) of isonicotinoyl chloride (0.28 g, 2.15 mmol, 1 eq.) and Et₃N (0.6 mL, 4.30 mmol, 2 eq.) was added dropwise to a solution of the *t*-Boc protected 3,6-dioxaoctanyl-1,8-diamine (0.53 g 2.15 mmol, 1 eq.). The solution was stirred 18 h at RT. The organic phase was washed with NaHCO₃ (5%, 100 mL) and water (100 mL). The organic phase was separated and dried over MgSO₄. The solvent was removed under vacuum. Then

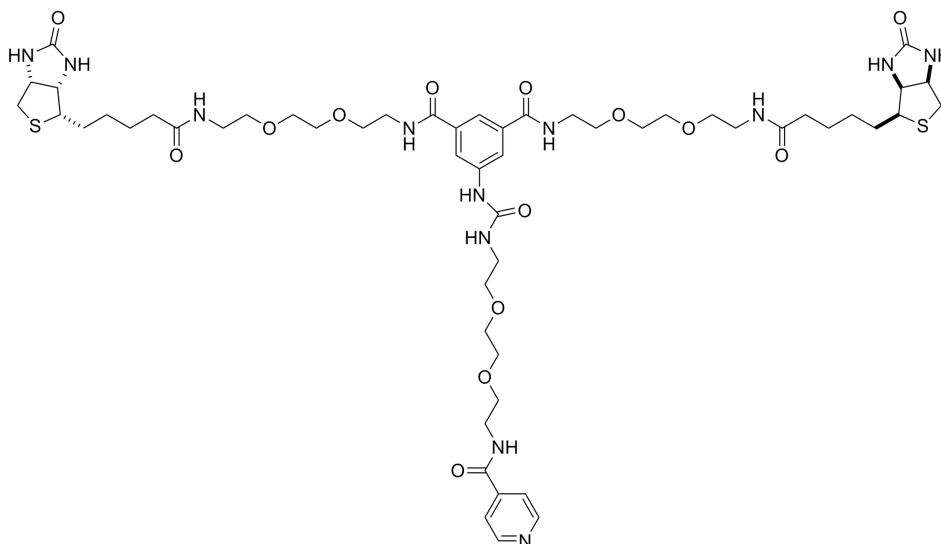
the crude product was purified by flash chromatography (Silicagel, AcOEt : MeOH (20 : 1)) to afford the pure product as a white solid (0.26 g, 0.73 mmol, 34% yield).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 27°C) : δ 1.40 (s, 9H; *t*Bu), 3.27 (m, 2H; Py-NH- CH_2 - CH_2), 3.47 (m, 2H, NH- CH_2 - CH_2), 3.61 (m, 4H; O- CH_2 - CH_2 -O), 3.65 (m, 4H; CH_2 -O- CH_2 - CH_2 -O- CH_2), 5.03 (br s, 1H; NH), 5.82 (br s, 1H; NH), 7.0-9.0 (m, 4H; CH); ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 27°C) : δ 28.7, 40.2, 40.6, 69.9, 70.5, 70.7, 71.1, 79.8, 121.4, 142.0, 150.9, 156.4, 166.0; APCI-MS for $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5$: 353.9 (100) $[\text{M}+1]^+$.



The final product **5** was obtained by deprotection of the *t*-Boc group in pure TFA. The product was dried under vacuum and was dissolved in a small amount of MeOH. Then Et_3N was added and the solution was stirred over 10 min. The solvent was dried under vacuum. This product was used in the next step without purification.

3.2.4. Synthesis of Biot₂-Py: **6**.



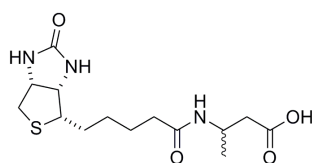
4 (0.17 g, 0.18 mmol, 1 eq.) was dissolved in TFA (1 mL). The reaction was allowed to stir for 10 min, and the excess of TFA was removed under a gentle stream of nitrogen (in a fume hood). The residue was dissolved in a minimal amount of MeOH, and an excess of Et₃N (1 mL) was added. The mixture was stirred for 10 min, and the volatiles were removed under vacuum. The crude biotin dimer was further dried under vacuum. The crude was added to a solution of thiocarbonyldiimidazole (0.036 g, 0.20 mmol, 1.1 eq) in DMF (4 mL). The reaction was stirred at room temperature for 30 min and then taken to dryness under a stream of nitrogen to yield a intermediate product which was directly used in the following step. **5** (0.048 g, 0.19 mmol, 1.05 eq) was added to the solution, and the reaction was stirred for 30 min at RT. The reaction mixture was then triturated with ether (50 mL) and stirred for 1 h until the solution became clear. The ether was decanted, and the crude product was dissolved in a minimal amount of MeOH, and was loaded onto silicagel column. The product was eluted with AcOEt (100 mL) and then increasing concentration of MeOH in AcOEt until the product

eluted (100% MeOH). The pure product was obtained as a brownish solid (0.04 g, 0.03 mmol, 10% yield).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 27°C) : δ 1.20-1.70 (m, 12H; CH_2), 2.06 (t, J = 7.4 Hz, 4H; CH_2), 2.50 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-NH-Py}$), 2.60 (m, 2H, $\text{CH-CH}_2\text{-S}$), 2.80 (m, 2H; $\text{CH-CH}_2\text{-S}$), 3.08 (m, 2H; S-CH-CH), 3.17 (m, 8H, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 3.38 (m, 14H; C(S)-NH-CH_2 and $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 3.53 (m, 12H; $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2$), 4.12 (m, 2H; NH-CH-CH), 4.30 (m, 2H; NH-CH-CH_2), 5.43 (m, 1H; NH-C(S)-NH-CH_2), 6.36-6.43 (m, 4H; NH-C(O)-NH), 7.10-8.80 (m, 7H; CH); ^{13}C NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , 27°C) : δ 26.1, 28.9, 29.1, 36.0, 39.3, 40-45, 56.3, 60.1, 61.9, 69.7, 70.2, 70.4, 113.9, 115.9, 122.1, 135.7, 140.4, 149.6, 163.6, 166.5, 167.6, 173.1; ESI-MS for $\text{C}_{53}\text{H}_{80}\text{N}_{12}\text{O}_{13}\text{S}_3$: 1189 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.3. Experimental procedure for the synthesis of 12.

3.3.1. 3-(biotinamido) butanoic acid: 7.

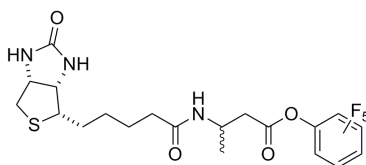


A DMF solution (25 mL) of 3-aminobutanoic acid (0.49 g, 4.77 mmol, 1.25 eq.) and Et_3N (1.10 mL, 7.96 mmol, 2.1 eq.) was added dropwise under N_2 to a DMF solution (50 mL) of biotin pentafluorophenol (1.56 g, 3.80 mmol, 1 eq.).^[229] The solution was stirred 22 h at RT. The solvent was removed under vacuum. The solid was recrystallized in a minimum

amount of CH₃CN, filtrated and then dried under vacuum. The pure product was obtained as a white solid (1.13g, 3.42 mmol, 90% yield).

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄, 27°C) : δ 1.21 (dd, J= 6.7 Hz, J=2.0 Hz, 3H), 1.32 (d, J=0.7 Hz, 1H), 1.46 (m, 2H), 1.65 (m, 4H), 2.20 (m, 2H), 2.47 (m, 2H), 2.72 (d, J= 12.8 Hz, 1H), 2.94 (ddd, J= 12.8 Hz, J= 7.9 Hz, J= 4.5 Hz, 1H), 3.22 (m, 1H), 4.29 (ddd, J=19.7 Hz, J= 7.9 Hz, J= 4.5 Hz, 2H), 4.51 (dd, J= 7.8 Hz, J= 5.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (100.6 MHz, MeOH-d₄, 27°C) : δ 19.5, 25.8, 28.4, 28.6, 35.8, 40.0, 40.7, 42.6, 55.9, 60.6, 62.3, 165.2, 174.0, 174.2; APCI-MS for C₁₄H₂₃N₃O₄S : 330 (100) [M+H]⁺; IR (KBr, cm⁻¹): 3322, 3067, 2928, 2850, 1702, 1627, 1574, 1541, 1495, 1462, 1449, 1435, 1410, 1310, 1269, 1243, 1201, 1152, 1088, 1045, 968, 907, 870, 843, 824, 727, 660, 641, 599, 533; TLC R_f= 0.10 (MeOH : AcOEt / 1 : 2).

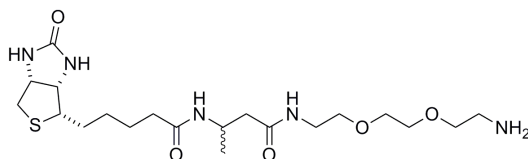
3.3.2. 3-(biotinamido) butanoate pentafluorophenyl ester: **8**.



A DMF solution (50 mL) of pentafluorophenol (0.87 g, 4.77 mmol, 1.2 eq.) and DCC (3.26 g, 15.77 mmol, 4 eq.) was added dropwise to a DMF solution (100 mL) of **7** (1.31 g, 3.98 mmol, 1 eq.). The solution was stirred 17 h at RT. The solvent was removed under vacuum at 80°C. The crude solid was dissolved in CHCl₃ (200 mL). The organic phase was washed with a solution of NaHCO₃ (3 x 200 mL) and water (2 x 200 mL). The organic phase was dried over MgSO₄ and the solvent was removed under vacuum to give a white solid (1.94 g, 39.4 mmol, 99% yield).

^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4 , 27°C) : δ 1.19 (m, 3H), 1.36 (m, 2H), 1.70 (m, 4H), 1.89 (m, 2H), 2.20 (m, 2H), 2.22 (t, J= 7.8 Hz, 2H), 2.94 (m, 1H), 3.23 (m, 1H), 3.47 (m, 1H), 4.31 (m, 1H), 4.41 (q, J= 6.7 Hz, 1H), 4.50(m, 1H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, MeOH- d_4 , 27°C) : δ 19.3, 25.1, 27.7, 33.8, 35.8, 39.2, 40.0, 42.6, 56.0, 60.6, 62.3, 158.9, 165.1, 167.4, 174.4; APCI-MS for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 494 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$; IR (KBr, cm^{-1}): 3325, 3071, 2929, 2850, 2665, 2462, 2119, 1790, 1702, 1626, 1575, 1521, 1462, 1445, 1435, 1383, 1361, 1346, 1311, 1269, 1243, 1186, 1142, 1120, 1087, 1045, 1002, 892, 868, 842, 802, 761, 727, 641, 599, 571, 537; TLC R_f = 0.60 (MeOH : AcOEt / 1 : 2).

3.3.3. 1-*N'*-(8-amino-3,6-dioxaoctanyl)-3-(biotinamido) butanamide: **9**.

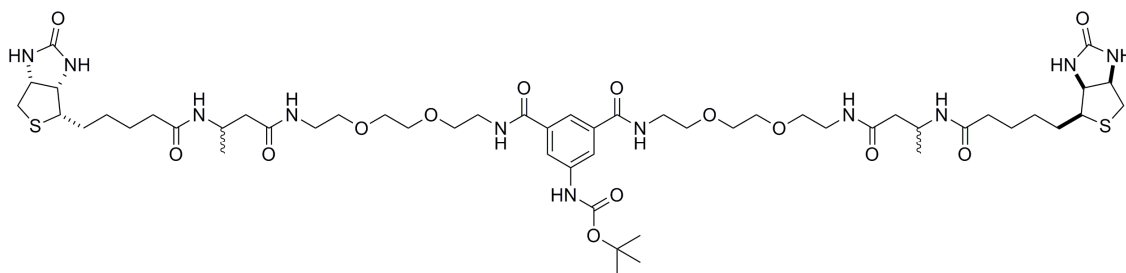


A DMF solution (50 mL) of **8** (1.97 g, 3.98 mmol, 1 eq.) was added dropwise to a DMF solution (150 mL) of 3,6-dioxaoctanyldiamine (6.0 mL, 40.96 mmol, 10 eq.) and Et_3N (1.10 mL, 7.96 mmol, 2 eq.). The solution was stirred 17 h at RT. The solvent was removed under vacuum at 80°C. The solid was triturated with ether (100 mL), filtrated and was dissolved in a minimum amount of MeOH : AcOEt (3 : 7). Chromatography using a EtOAc : MeOH gradient allowed to isolate the product. The solvent was removed under vacuum and the solid was redissolved in a minimum amount of MeOH and was precipitated upon addition of ether (0.65 g, 1.43 mmol, 36% yield).

^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4 , 27°C) : δ 1.19 (d, J= 6.6 Hz, 3H), 1.46 (dd, J= 15.1 Hz, J= 7.4 Hz, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.75 (m, 2H), 2.20 (t, J= 7.3 Hz, 2H), 2.37 (ddd, J= 52.0

Hz, J= 13.9 Hz, J= 6.8 Hz, 2H), 2.72 (d, J= 12.7 Hz, 1H), 2.82 (t, J= 5.3 Hz, 2H), 2.95 (dd, J= 12.7 Hz, 4.9 Hz, 1H), 3.23 (m, 1H), 3.38 (t, J= 5.4 Hz, 2H), 3.55 (dd, J= 10.3 Hz, J= 5.8 Hz, 4H), 3.64 (s, 4H), 3.72 (m, 2H), 4.33 (dd, J= 7.8 Hz, J= 4.5 Hz, 1H), 4.51 (dd, J= 7.8 Hz, J= 4.9 Hz, 1H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, MeOH- d_4 , 27°C) : δ 19.4, 25.8, 28.5, 28.7, 35.9, 39.3, 40.0, 41.0, 42.5, 43.3, 56.0, 60.6, 62.3, 69.6, 70.3, 70.4, 72.3, 165.1, 172.3, 174.1; ESI-MS for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{F}_5\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 458 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$; IR (KBr, cm^{-1}): 3290, 3078, 2928, 2827, 2119, 1698, 1547, 1460, 1383, 1322, 1266, 1242, 1202, 1118, 939, 909, 885, 870, 856, 825, 761, 725, 599; TLC R_f = 0.00 (MeOH).

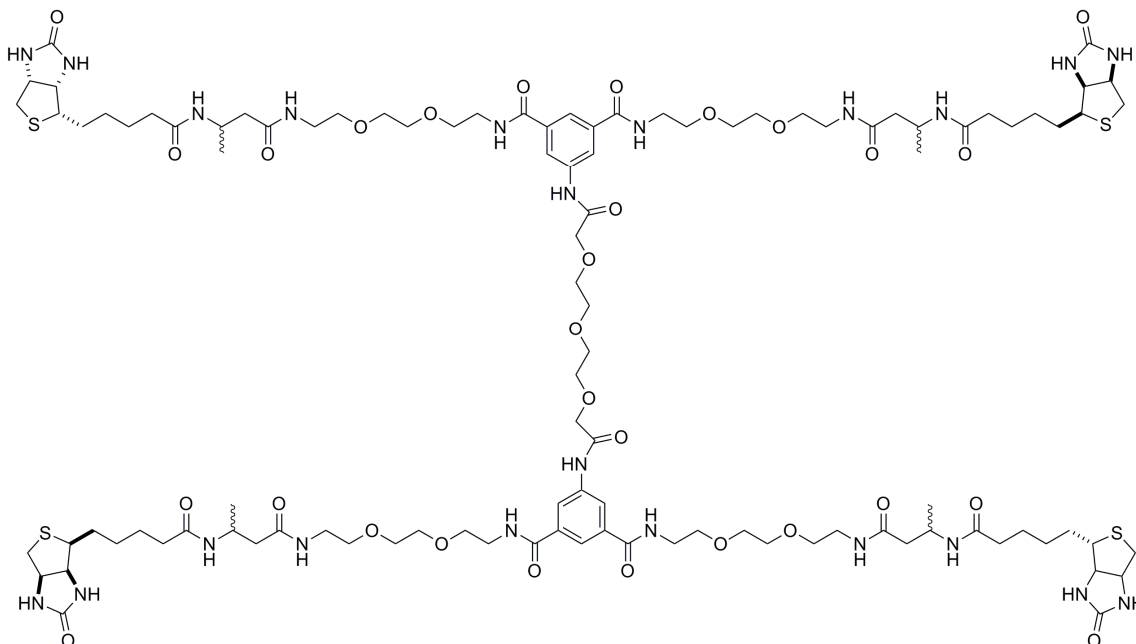
3.3.4. 1-*N'*-(8-amino-3,6-dioxaoctanyl)-3-(biotinamido) butanamide: **10**.



A DMF solution (20 mL) of *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-5-aminoisophthalate bis pentafluorophenyl ester (0.09 g, 0.15 mmol, 1 eq.) was added dropwise over 30 min to a solution of **9** (0.69 g, 1.50 mmol, 10 eq.) and Et_3N (0.10 mL, 0.72 mmol, 4.8 eq.) in DMF (10 mL). The solution was stirred at room temperature for 2 h. The solvent was removed under vacuum. The crude product was dissolved in a minimum amount of MeOH. This solution was loaded onto a silicagel column and was eluted using a AcOEt : MeOH gradient. The product eluted using a mixture of MeOH : AcOEt (2 : 3). The pure product was obtained as a colourless solid (0.045 g, 0.039 mmol, 26% yield).

^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4 , 27°C) : δ 1.17 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 1.43 (q, J = 7.4 Hz, 4H), 1.55 (s, 9H), 1.61 (m, 4H), 1.71 (m, 4H), 2.18 (t, J = 7.4 Hz), 2.35 (ddd, J = 51.1 Hz, J = 13.4 Hz, J = 6.6 Hz, 4H), 2.70 (d, J = 12.7 Hz, 2H), 2.93 (dd, J = 12.3 Hz, J = 5.7 Hz, 2H), 3.20 (m, 2H), 3.62 (m, 24 H), 4.25 (m, J = 6.8 Hz), 2H), 4.31 (dd, J = 7.7 Hz, J = 4.4 Hz, 2H), 4.50 (dd, J = 7.8 Hz, 4.9 Hz, 2H), 7.91 (t, J = 1.5 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 1.5 Hz, 2H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, MeOH- d_4 , 27°C) : δ 19.6, 25.9, 27.8, 28.5, 28.7, 35.9, 39.3, 40.0, 40.0, 42.5, 43.3, 56.0, 60.6, 62.3, 69.6, 69.6, 70.3, 70.4, 80.4, 120.0, 120.2, 135.9, 140.5, 154.0, 165.1, 168.5, 172.3, 174.1; ESI-MS for $\text{C}_{53}\text{H}_{85}\text{N}_{11}\text{O}_{14}\text{S}_2$: 1186.5 (100) $[\text{M}-\text{Na}]^+$; TLC R_f = 0.90 (MeOH : AcOEt / 1 : 2).

3.3.5. Synthesis of tetra biotinylated ligand: **12**.



A TFA solution (1 mL, 13.41 mmol, 350 eq.) was added to a solution of **10** (44.8 mg, 0.039 mmol, 2 eq.) in DMF (1 mL). The solution was stirred 30 min and the solvent and TFA

was removed under vacuum. Then a solution of Et₃N (1 mL, 6.93 mmol, 180 eq.) and a DMF solution (1 mL) containing bis(perfluorophenyl) 2,2'-(2,2'-oxybis(ethane-2,1-diyl) bis(oxy)diacetate. The solution was stirred 36 h at 65°C. The solvent was removed under vacuum. The crude product was dissolved in a minimum amount of MeOH. This solution was loaded onto a silicagel column and was eluted using MeOH : AcOEt / 1 : 1. The pure product was obtained as a colorless solid (6.1 mg, 0.002 mmol, 17% yield).

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄, 27°C) : δ 1.17 (d, J= 6.6 Hz, 12H), 1.44 (q, J= 7.4 Hz, 8H), 1.65 (m, 16H), 2.18 (t, J= 7.0 Hz, 8H), 2.36 (ddd, J= 49.6 Hz, J= 13.9 Hz, J= 6.8 Hz, 8H), 2.71 (d, J= 12.7 Hz, 4H), 2.93 (ddd, J= 10.2 Hz, J= 5.6 Hz, J= 1.2 Hz, 4H), 3.20 (m, 8H), 3.62 (m, 56H), 4.21 (q, J= 7.3 Hz, 4H), 4.23 (dd, J= 13.2 Hz, J= 6.72 Hz, 4H), 4.31 (dd, J= 7.9 Hz, J= 4.4 Hz, 4H), 4.50 (dd, J= 7.8 Hz, J= 5.1 Hz, 4H), 7.25 (d, J= 1.5 Hz, 4H), 7.50 (t, J= 1.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (100.6 MHz, MeOH-d₄, 27°C) : δ 19.5, 25.9, 28.5, 28.7, 28.7, 35.9, 39.3, 39.9, 40.1, 42.5, 43.3, 46.7, 48.0, 56.0, 60.6, 62.3, 65.9, 69.6, 70.3, 70.4, 114.6, 116.2, 136.1, 149.1, 165.1, 169.2, 172.3, 174.1; APCI-MS for C₁₀₄H₁₆₄N₂₂O₂₉S₄ : 578.1 (100) [M/4]⁴⁺; TLC R_f= 0.09 (MeOH : AcOEt / 1 : 1).

3.4. Polystyrene spin coating on silicon or glass plates.

The plate was washed with a “pirhanas” solution (H₂SO₄ : H₂O₂ / 2 : 1) at 120°C for 10 min. Then the plate was rinsed with milliQ water for 5 min and the plate was dried with a flow of N₂. The plate was spin-coated with a drop of 2% polystyrene solution in toluene. Condition of spin-coating was 4000 rpm (revolution per minute) for 60 s. A drop of protein solution was adsorbed on the surface for different time (1 min to 2 h) then the excess of solution was absorbed with a special paper and dried with a flux of N₂.

4. Experimental procedure for the Asymmetric Allylic Alkylation.

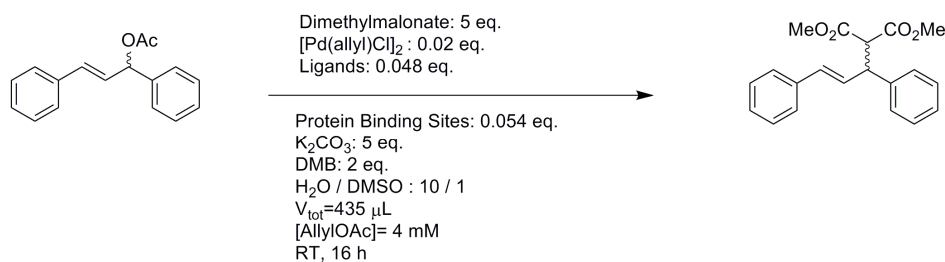
4.1. Protein expression and purification.

Native, white egg avidin was obtained from Belovo and used without further purification. Recombinant streptavidin isoforms were engineered, expressed, purified and quantified as previously described.^[76] The work was carried out by the biologists in the group: Dr. N. Humbert, Dr. A. Zocchi, Dr. M. Creus, Dr. A. Ivanova, A. Sardo and T. Wohlschlager.

4.2. Protein expression and purification.

All chemicals were of reagent grade and used as received. 1,3-Diphenylallylacetate was synthesized according to a published procedure.^[236] The general procedure for the synthesis of biotinylated ligands bearing enantiopure spacers has been described previously.^[79]

4.3. Experimental Procedure for the chemogenetic screening of artificial allylic alkylases.



Apart from the extraction and isolation of the product, all operations were performed in a glove-box with oxygen-free solvents (nitrogen bubbling for several hours).

The ligand (8 mM stock-solution) and the Pd-precursor (6.8 mM stock solution) were dissolved in DMSO, mixed and stirred for 5 min at room temperature. (Strept)avidin was dissolved in water (275 μ L of a 82 μ M stocksolution, 0.092 μ mol, 1.4 eq. active sites vs. metal) and mixed in a vial with the Pd-complex (20 μ L of the stock-solution, 0.068 μ mol metal) and stirred at room temperature for 30 min. Dimethylmalonate (43 μ L, 0.34 mmol) and 1,3-diphenylpropenylacetate (17.1 mg, 0.068 mmol) were dissolved in DMSO (800 μ L) and 20 μ L of the resulting solution were added to the previous mixture. Finally, didodecyldimethylammonium bromide (60 μ L of 0.056 M a stock solution) and potassium carbonate (60 μ L of 0.14 M a stock-solution) were added to the catalysis mixture. The resulting cloudy mixture was stirred at room temperature for 18 h. After completion, the reaction was extracted with Et₂O (2 x 500 μ L), filtered through a short silicagel plug and subjected to HPLC analysis.

4.4. Protocol for the Asymmetric Allylic Alkylation for the isolation and characterization of the products.

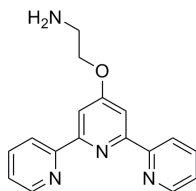
The S112A Sav (active sites = 3.2; 120 mg, 1.46 μ mol) was dissolved in milliQ (mQ) water (13.7 mL). In another flask, the **Biot-4^o-1** ligand (4.13 mg, 5.2 μ mol) was dissolved in DMSO (510 μ L). [Pd(Ph₂allyl)Cl]₂ (1.46 mg, 2.2 μ mol) was also dissolved in DMSO (510 μ L). Both solutions were mixed and stirred for 15 min at room temperature. The resulting clear yellow solution was added to the aqueous S112A Sav solution, and stirred for 30

minutes. Dimethylmalonate (62 μL , 0.55 mmol) and 1,3-diphenylpropenylacetate (27.6 mg, 0.11 mmol), both dissolved in DMSO (510 μL each) were added to the above mixture. This step was followed by the addition of solutions of didodecyldimethylammonium bromide (101.3 mg, 0.22 mmol) and potassium carbonate (75.6 mg, 0.55 mmol) dissolved in mQ water (3.06 mL each). The resulting cloudy mixture was stirred for 16 h, and diluted with 10 mL water. The product was extracted with diethylether (3 x 25 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and evaporated *in vacuum*. The oily residue was purified by chromatography on silica gel (hexane:ethylacetate 5:1) to afford the product as a colorless oil (33.5 mg, 94% yield, +90% ee).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 27°C) : δ 3.55 (s, 3H; CH_3), 3.75 (s, 3H; CH_3), 4.0 (d, $J = 11$ Hz, 1H; H_1), 4.3 (dd, $J = 8$ Hz, $J = 11$ Hz, 1H; H_2), 6.35 (dd, $J = 8$ Hz, $J = 15.8$ Hz, 1H; H_3), 6.5 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H; H_4), 7.2-7.4 (m, 10H; PhH).

4.5. Experimental procedure for the synthesis of biotinylated ligand Biot-terpy.

4.5.1. 4'-O-ethanolamine-2,2':6',2''-terpyridine.

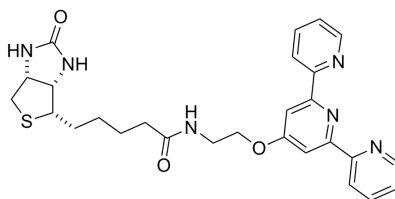


To a stirred suspension of powdered KOH (0.21 g, 3.75 mmol, 5 eq.) in dry DMSO (5 mL) at 80°C, the ethanolamine (0.046 mL, 0.75 mmol, 1 eq.) was added. After 30 min, 4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridine was added (0.2 g, 0.75 mmol, 1eq.) and the mixture was stirred

for 4 h at 70°C and then poured into 200 mL of distilled water. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄ and evaporated in vacuum, and the residue was purified by column chromatography (CH₂Cl₂ : MeOH / 4 : 1). The solvent was removed in vacuum giving the pure product as a white solid (0.1 g, 0.34 mmol, 46% yield).

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, 27°C) : δ 1.73 (bs, 2H; NH₂), 3.18 (t, J= 5.0 Hz, 2H; CH₂-NH₂), 4.29 (t, J= 5.2 Hz, 2H; CH₂-O), 7.34 (m, 2H; CH), 7.85 (m, 2H; CH), 8.05 (s, 2H; CH), 8.66 (m, 4H; CH).

4.5.2. Biot-terpy.



To a solution of 4'-*O*-ethanolamine-2,2':6',2''-terpyridine (0.1 g, 0.34 mmol, 1eq.) in DMF (2 mL), the biotin pentafluorophenol (0.15 g, 0.37 mmol, 1.1 eq.) and Et₃N (0.24 μL, 1.7 mmol, 5 eq.) in DMF (2 mL) was added. The solution was stirred 24 h at RT. The residue was purified by column chromatography (AcOEt : MeOH / 10 : 1). The solvent was removed in vacuum giving the pure product as a white solid (0.107 g, 0.21 mmol, 61% yield).

¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄, 27°C) : δ 1.25-1.75 (m, 6H; CH₂), 2.27 (m, 2H; CH₂), 2.70 (m, 2H; CH₂-S), 3.03 (m, 1H; S-CH-CH), 3.71 (m, 2H; NH-CH₂), 4.13 (m, 1H; NH-CH-CH), 4.32 (m, 1H; NH-CH-CH₂), 4.36 (t, J= 5.3 Hz, 2H; CH₂-CH₂-O), 7.49 (m, 2H; CH), 8.01 (m, 4H; CH), 8.62 (m, 2H; CH), 8.69 (m, 2H; CH); ¹³C NMR (100.6 MHz, MeOH-d₄,

27°C) : δ 25.9, 28.4, 28.6, 35.7, 38.9, 39.9, 55.9, 60.5, 62.2, 67.0, 107.5, 121.9, 124.5, 137.7, 149.1, 156.1, 157.4, 165.0, 167.5, 175.5; ESI-MS for C₂₇H₃₀N₆O₃S : 541.4 (100) [M+Na]⁺.

4.6. Analytical Data.

Analytical Daicel Chiralpak® IA column, 4.6 mm x 250 mm, particle size 5 μ m.

Mobile phase: hexane/isopropanol 95/5.

Flow rate: 0.8 ml/min

Room temperature

Retention times:

1,3-Diphenylallylacetate (starting material): 7.3 min

Enantiomer (*S*): 12.4 min

Enantiomer (*R*): 15.0 min

1,3-Diphenylallyl alcohol (hydrolysis product): 19.4 min

5. Experimental procedure for the Asymmetric Hydrogenation.

5.1. General procedure for hydrogenation.

The solvents and the substrate (in the case of liquid CAAEt) were degassed 3 h by N₂ bubbling. The ligands were weighed individually on a precision balance (+/- 0.1 mg), as well as the metal precursor, and transferred in a glove box (N₂: purity 50). A 10mL tube equipped with a magnetic stirring bar was charged with an aliquot of catalytic precursor dissolved in the

substrate. EtOH was added, followed by the rest of substrate needed for catalysis. The reaction tubes were transferred in a 20 well thermostated stainless steel, Teflon-coated autoclave and closed. The reactor was connected to the hydrogenation apparatus and submitted first to argon pressure (10 bars quality 46) and the pressure was released. After four cycles, the autoclave was charged with hydrogen (50 bars quality 45) and the pressure was released. After four cycles, the pressure was set to 50 bars and the temperature to 60°C. After 15 minutes, magnetic stirring was started. After 2 h, heating was stopped and the pressure was released after the temperature had reached 30°C. An aliquot of the resulting solution (5 to 10 μ L) was dissolved in 1 mL AcOEt and injected without further treatment in GC.

5.2. Analytical Method.

The method of determination of conversion and enantiomeric excess were delivered by GC.

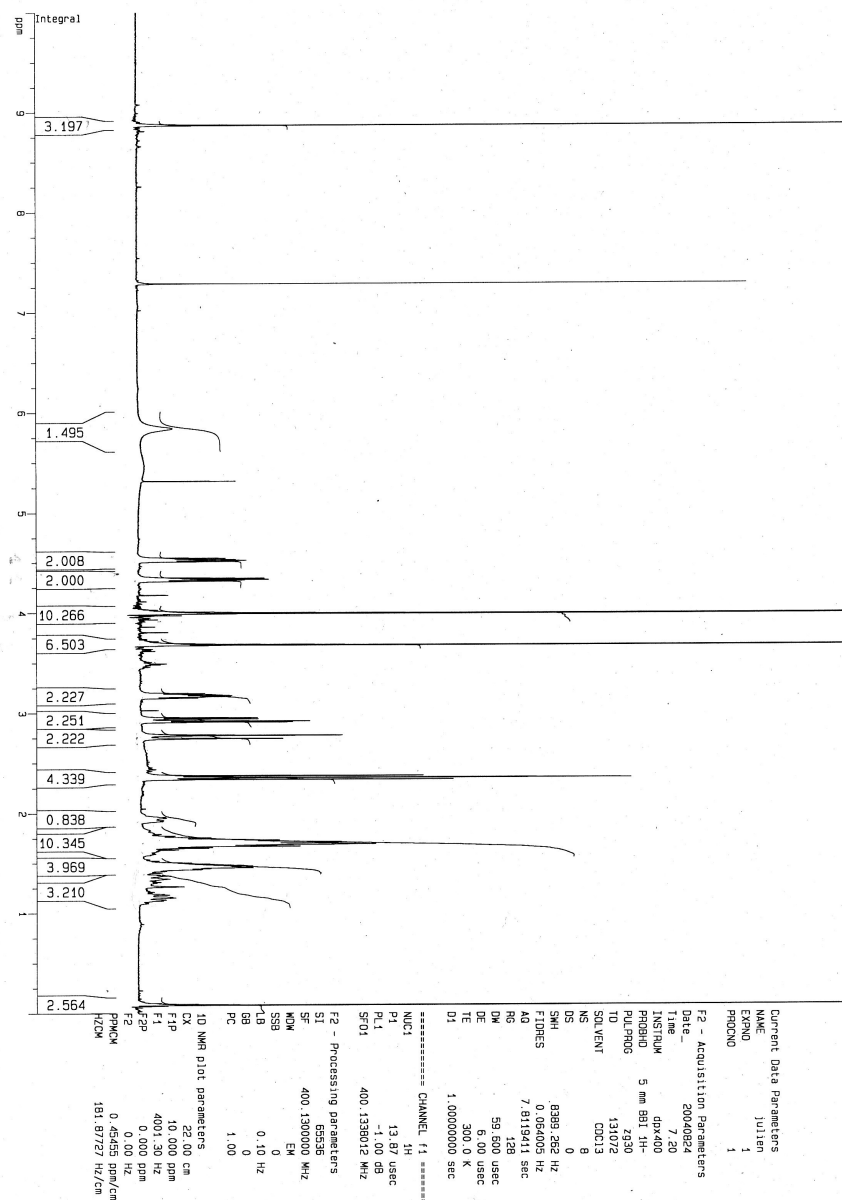
Column:	Lipodex-E; ϕ =0.25mm; length=25m
Vector Gas:	Helium
Temperature Program:	Initial=60°C; Time=0 min Rate1= 6°C/ min; Final1=105°C; Time1=18 min Rate2= 25°C/ min; Final1=200°C; Time1=0 min
Total Time:	29.3 min
Injection volume:	2 μ L
Sample preparation:	No filtration; 5 to 10 μ L volume of catalytic solution diluted in 1 mL AcOEt
Average Velocity:	30cm/ sec
Temperature Injector:	200°C
Temperature Detector	210°C

Retention Time:

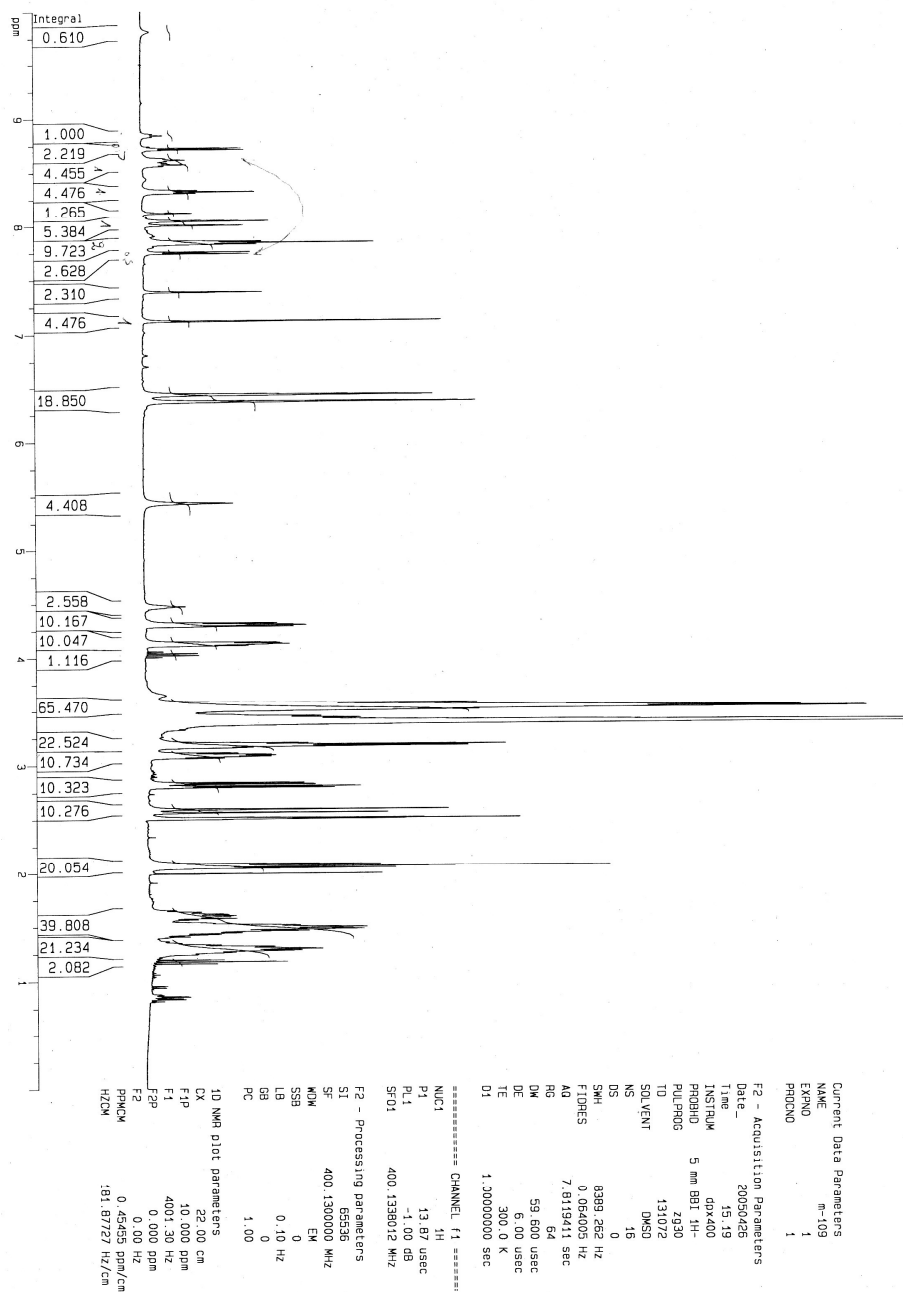
CAAEt 17.6 min; (R)-Product 22.8; (S)-Product 24.0 min; By-product 19.7 min and 25.3 min

6. Annex.

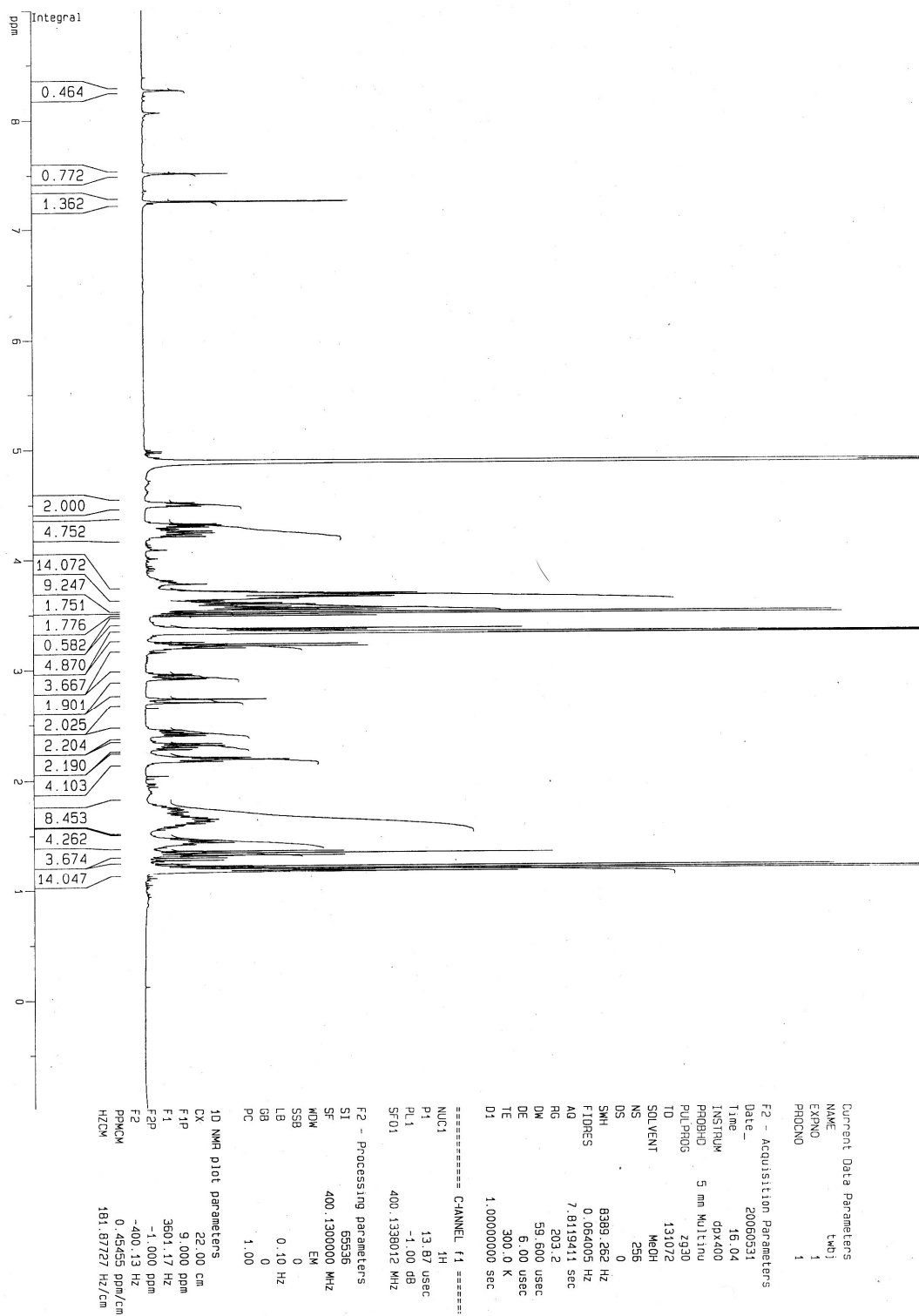
6.1. NMR spectrum of 2.



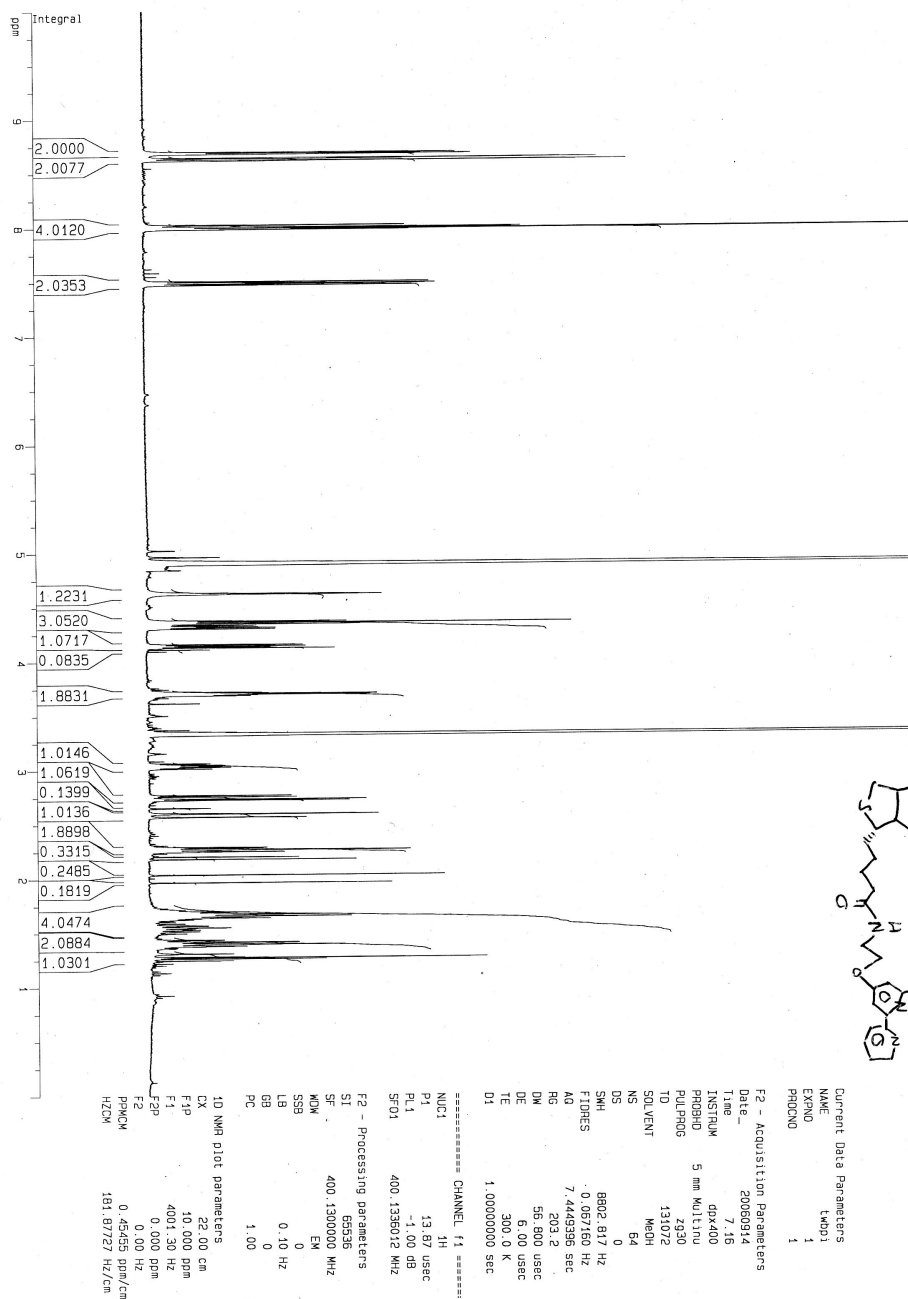
6.2. NMR spectrum of 6.



6.3. NMR spectrum of 12.



6.4. NMR spectrum of Biot-terpy.



0533

7. Appendices.

7.1. Tableau de catalyse pour l'hydrogénation des β -cétoesters.

Ligand	Complexe	Substrat	Solvant	T (en °C)	Additif	% Conv.	% ee ^[a]
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	30	-86.6
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	100	-	100	-94.5
(<i>S</i>)-difluorophos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	100	-	100	98.8
(<i>S</i>)-Cy-Soniphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	100	-	100	98.3
(<i>S</i>)-Cl-MeO-biphep	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	100	-	100	97.9
(<i>S</i>)-Me-soniphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	100	-	100	97.3
(<i>R,R</i>)- <i>i</i> Pr-duphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	100	-	20	95.5
(<i>S</i>)-MeO-biphep	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	100	-	100	94.2
(<i>S</i>)-synphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	100	-	100	93.0
(<i>S</i>)-tol-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	100	-	100	92.3
(<i>S</i>)-3,5-xylyl-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	100	-	100	90.6
(<i>S</i>)-MeO-biphep	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	21	-84.6
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	30	-86.7
(<i>S</i>)-tol-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	27	78.3
(<i>R</i>)-solphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	40	-68.7
(<i>S</i>)-MeO-biphep	RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	6	-86.8
(<i>R</i>)-binap	RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	8	-91.1
(<i>S</i>)-tol-binap	RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	19	88.0

(<i>R</i>)-solphos	$\text{RuCl}_2(\text{p-cymène})_2$	CAAEt	EtOH	60	-	55	-74.0
(<i>S</i>)-MeO-biphep	$\text{RuCl}_3 \cdot \text{nH}_2\text{O}$	CAAEt	EtOH	60	-	12	-82.0
(<i>R</i>)-binap	$\text{RuCl}_3 \cdot \text{nH}_2\text{O}$	CAAEt	EtOH	60	-	10	-82.5
(<i>S</i>)-tol-binap	$\text{RuCl}_3 \cdot \text{nH}_2\text{O}$	CAAEt	EtOH	60	-	22	76.9
(<i>R</i>)-solphos	$\text{RuCl}_3 \cdot \text{nH}_2\text{O}$	CAAEt	EtOH	60	-	12	-72.1
(<i>S</i>)-MeO-biphep	$\text{RuI}_2(\text{p-cymène})_2$	CAAEt	EtOH	60	-	0	-
(<i>R</i>)-binap	$\text{RuI}_2(\text{p-cymène})_2$	CAAEt	EtOH	60	-	0	-
(<i>S</i>)-tol-binap	$\text{RuI}_2(\text{p-cymène})_2$	CAAEt	EtOH	60	-	0	-
(<i>R</i>)-solphos	$\text{RuI}_2(\text{p-cymène})_2$	CAAEt	EtOH	60	-	0	-
(<i>R</i>)-binap	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	30	-86.7
(<i>R</i>)-MeO-biphep	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	21	-84.6
(<i>S</i>)-Me-soniphos	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	6	95.7
(<i>S</i>)-synphos	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	4	90.8
(<i>R</i>)-solphos	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	40	-68.7
(<i>S</i>)-C ₁ -tunephos	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	28	90.1
(<i>S</i>)-difluorophos	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	<2	-
(<i>R,R</i>)- <i>i</i> Pr-duphos	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	<1	-
Catasium T ₂	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	16	-47.0
(<i>R</i>)-Me-bophoz	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	<2	-
SL-W009-1	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	89	-78.8
SL-T001-1	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	95	-84.5
(<i>R</i>)-binap	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	30	-86.7
(<i>R</i>)-binap ^[b]	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]_2$	CAAEt	EtOH	60	-	96	-85.2
SL-W005-1	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]$	CAAEt	EtOH	60	-	96	-66.3
SL-T001-1	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]$	CAAEt	EtOH	60	-	95	-84.5
SL-W009-1	$[\text{RuCl}_2(\text{benzène})]$	CAAEt	EtOH	60	-	89	-78.8

(<i>R</i>)-solphos	[RuCl ₂ (benzène)]	CAAEt	EtOH	60	-	52	-69.8
SL-W006-1	[RuCl ₂ (benzène)]	CAAEt	EtOH	60	-	49	-84.5
(<i>S</i>)-xylyl-binap	[RuCl ₂ (benzène)]	CAAEt	EtOH	60	-	44	-71.2
(<i>R,S</i>)-josiphos	[RuCl ₂ (benzène)]	CAAEt	EtOH	60	-	0	-
(<i>R</i>)-MeO-biphep ^[b]	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	46	-83.5
(<i>R</i>)-MeO-biphep	[Ru(met) ₂ COD] ₂ HBr	CAAEt	EtOH	60	-	78	-88.2
(<i>R</i>)-Cl-MeO-biphep	[Ru(met) ₂ COD] ₂ HBr	CAAEt	EtOH	60	-	86	94.6
(<i>R</i>)-binap	[Ru(met) ₂ COD] ₂ HBr	CAAEt	EtOH	60	-	96	-72.5
SL-W006-1	RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène) ₂	CAAEt	EtOH	60	-	5	-71.5
(<i>R</i>)-solphos	RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène) ₂	CAAEt	EtOH	60	-	49	-73.6
(<i>S</i>)-Cy-soniphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	6	95.8
(<i>S</i>)-Cy-soniphos	RuCl ₃ · <i>n</i> H ₂ O	CAAEt	EtOH	60	-	5	90.9
(<i>S</i>)-Me-soniphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	6	95.7
(<i>S</i>)-C ₃ -tunephos	RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène) ₂	CAAEt	EtOH	60	-	4	-94.1
(<i>S</i>)-C ₃ -tunephos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	23	92.1
(<i>S</i>)-Cl-MeO-biphep	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	6	94.0
(<i>S</i>)-tol-binap	RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène) ₂	CAAEt	EtOH	60	-	24	92.9
(<i>R</i>)-binap	RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène) ₂	CAAEt	EtOH	60	-	8	-91.1
(<i>R</i>)-MeO-biphep	RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène) ₂	CAAEt	EtOH	60	-	8	-90.0
(<i>S</i>)-synphos	RuCl ₂ (<i>p</i> -cymène) ₂	CAAEt	EtOH	60	-	9	91.4
(<i>S</i>)-synphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	4	90.8
(<i>S</i>)-C ₁ -tunephos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	28	90.1
(<i>R</i>)-MeO-biphep	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	5	-90.0
(<i>R</i>)-C ₅ -tunephos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	35	-89.0
(<i>S</i>)-tol-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	28	78.3
(<i>S</i>)-tol-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂	60	-	30	93.4

			1/1				
(<i>S</i>)-tol-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/THF 1/1	60	-	23	88.0
(<i>S</i>)-tol-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/AcOEt 1/1	60	-	30	87.4
(<i>S</i>)-tol-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/acétone 1/1	60	-	29	78.9
(<i>S</i>)-tol-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 1/20	60	-	17	86.3
(<i>S</i>)-tol-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	-	25	81.9
(<i>S</i>)-C ₃ -tunephos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH	60	-	23	92.1
(<i>S</i>)-C ₃ -tunephos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 1/1	60	-	32	97.1
(<i>S</i>)-C ₃ -tunephos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/THF 1/1	60	-	5	54.4
(<i>S</i>)-C ₃ -tunephos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/AcOEt 1/1	60	-	20	81.5
(<i>S</i>)-C ₃ -tunephos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/acétone 1/1	60	-	23	70.8
(<i>S</i>)-C ₃ -tunephos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	-	15	90.2
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	HCl 2M 33éq./Ru	71	-62.1
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	HBr 73éq./Ru	64	-49.2
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	K ₂ HPO ₄ 10éq./Ru	53	-91.1

(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	B(OEt) ₃ 10éq./Ru	52	-87.3
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	NaOAc 10éq./Ru	51	-90.9
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	KOAc 10éq./Ru	49	-89.3
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	Et ₃ N 20éq./Ru	46	-92.0
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	NaTf 10éq./Ru	44	-87.1
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	EN 10éq./Ru	44	-93.1
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	K ₂ SO ₄ 10éq./Ru	39	-88.8
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	KBF ₄ 10éq./Ru	29	-92.2
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	NaCl 10éq./Ru	26	-89.1.
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	TBACl 3éq./Ru	26	-88.5
(<i>R</i>)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	CAAEt	EtOH/CH ₂ Cl ₂ 20/1	60	Al(acac) ₃ 10éq./Ru	23	-89.0
(<i>S</i>)-difluorophos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	100	-	100	95.4
(<i>S</i>)-Cy-soniphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	100	-	100	93.8
(<i>S</i>)-synphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	100	-	100	92.2
(<i>S</i>)-Me-soniphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	100	-	100	91.0
(<i>S</i>)-Cl-MeO-biphep	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	100	-	100	90.0

(R)-MeO-biphep	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	100	-	100	89.4
(R)-solphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	60	-	100	89.1
(R)-solphos	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	100	-	100	88.6
(S)-tol-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	100	-	100	84.6
(R)-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	100	-	100	79.2
(R)-Me-bophoz	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	100	-	100	56.2
(S)-3,5-xyly-binap	[RuCl ₂ (benzène)] ₂	EEC ^[c]	EtOH	100	-	100	56.2

Remarques : ^[a] L'excès énantiomérique > 0 correspond à [R] > [S] et l'excès énantiomérique < 0 correspond à [R] < [S] ; ^[b] Complexe préparé avant la catalyse et isolé ; ^[c] EET : ethyl ester de la carnitone..

7.2. Tableau de catalyse pour l'alkylation allylique asymétrique.

Ligand	Complexe	Protéine	Base	Surfactant	% Conv.	% ee ^[a]
Biot-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	21	29
Biot-2	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-1 ^{xy}	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	23	15
Biot-biphep	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-bipy ²	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-terpy	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	4	23
Biot-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	50	10
Biot-2	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-1 ^{xy}	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	17	6
Biot-biphep	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-bipy ²	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-terpy	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	-	2	16
Biot-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	SDS	0	0
Biot-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	21	29

Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	WT Sav	K_2CO_3	TDTB	4	36
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	WT Sav	K_2CO_3	MTOC	42	25
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	WT Sav	K_2CO_3	DDTB	1	42
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	WT Sav	K_2CO_3	TBTC	1	19
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	-	K_2CO_3	DMB	0	0
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112G	K_2CO_3	DMB	5	6
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112A	K_2CO_3	DMB	17	35
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112V	K_2CO_3	DMB	28	61
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112L	K_2CO_3	DMB	19	68
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112I	K_2CO_3	DMB	23	59
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112F	K_2CO_3	DMB	78	42
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112Y	K_2CO_3	DMB	17	-67
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112W	K_2CO_3	DMB	32	61
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	WT Sav	K_2CO_3	DMB	21	30
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112T	K_2CO_3	DMB	19	63
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112C	K_2CO_3	DMB	21	44
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112M	K_2CO_3	DMB	19	67
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112D	K_2CO_3	DMB	60	16
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112E	K_2CO_3	DMB	8	19
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112H	K_2CO_3	DMB	18	64
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112K	K_2CO_3	DMB	21	66
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112R	K_2CO_3	DMB	8	58
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112N	K_2CO_3	DMB	16	53
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112Q	K_2CO_3	DMB	11	54
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112G-N118T	K_2CO_3	DMB	4	24
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112G-V47G	K_2CO_3	DMB	15	57
Biot-1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	WT Avi	K_2CO_3	DMB	50	11
Biot-3 ¹ -1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	-	K_2CO_3	DMB	62	0
Biot-3 ¹ -1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112G	K_2CO_3	DMB	49	11
Biot-3 ¹ -1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112A	K_2CO_3	DMB	68	29
Biot-3 ¹ -1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112V	K_2CO_3	DMB	85	14
Biot-3 ¹ -1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112L	K_2CO_3	DMB	74	41
Biot-3 ¹ -1	$[\text{PdCl}(\eta^3\text{-allyl})]_2$	S112I	K_2CO_3	DMB	84	9

Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	90	14
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	89	12
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	66	17
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	39	5
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	83	21
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	68	15
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	86	16
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	69	14
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	79	7
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	79	31
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	84	27
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	47	41
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	70	6
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	56	20
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	15	37
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	54	45
Biot-3 ¹ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	66	9
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	23	76
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	18	41
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	23	-10
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	18	37
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	31	0
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	18	-34
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	19	-48
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	33	-60
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	23	-10
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	25	-44
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	12	7
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	25	26
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	8	20
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	10	-21
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	24	19

Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	16	15
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	17	0
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	18	-8
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	7	24
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	15	67
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	18	71
Biot-3 ² -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	20	50
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	4	0
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	13	65
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	14	44
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	21	48
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	27	30
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	29	-38
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	15	-18
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	50	-39
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	28	31
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	21	19
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	30	-20
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	10	11
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	19	43
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	4	-5
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	8	-34
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	7	15
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	12	15
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	25	28
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	13	15
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	24	72
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	15	41
Biot-3 ³ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	90	0
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	48	-34
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	18	18

Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	32	29
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	57	-6
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	43	12
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	60	-43
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	38	-36
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	59	-16
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	26	-11
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	40	0
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	78	-19
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	62	-17
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	38	-22
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	61	0
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	64	12
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	64	0
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	75	13
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	53	-10
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	54	-8
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	24	-8
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	28	-13
Biot-3 ⁴ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	94	0
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	71	0
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	90	88
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	75	88
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	99	69
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	98	43
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	99	38
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	98	0
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	94	46
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	88	53
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	58	71
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	97	33
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	85	49
Biot-4 ⁰ -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	98	41

Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	98	66
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	76	8
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	93	0
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	95	56
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	98	58
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	73	32
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	97	-44
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	93	85
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	70	0
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	97	-27
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	6	-18
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	4	-10
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	19	0
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	29	-21
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	39	8
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	22	-12
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	9	20
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	22	28
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	13	11
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	8	6
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	15	0
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	14	0
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	4	-35
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	8	19
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	16	-25
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	10	5
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	4	-7
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	9	0
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	4	0
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	2	-8
Biot-4 ^m -1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	79	5

Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	5	29
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	11	30
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	13	22
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	33	20
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	35	0
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	33	10
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	15	23
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	17	11
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	28	9
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	16	36
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	42	15
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	31	0
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	6	27
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	6	16
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	10	29
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	69	26
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	36	42
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	8	21
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	23	20
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	3	15
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	3	29
Biot-4 ^p -1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	80	0
Biot-(S)-Phe-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	71	56
Biot-(S)-Phe-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	73	-18
Biot-(S)-Phe-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	68	-28
Biot-(S)-Phe-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	59	-20
Biot-(S)-Phe-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	55	0
Biot-(S)-Phe-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	52	0
Biot-(S)-Phe-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	35	0
Biot-(S)-Phe-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	60	-15
Biot-(S)-Phe-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	47	-21
Biot-(S)-Phe-1	[PdCl(η ³ -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	64	-19

Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	54	-18
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	47	16
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	50	6
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	88	-5
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	50	7
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	85	-22
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	56	5
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	35	-19
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	72	-19
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	46	0
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	83	-8
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	70	5
Biot-(<i>S</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	70	38
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	14	-26
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	17	-37
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	58	41
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	58	-24
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	46	13
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	68	-51
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	23	7
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	72	0
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	49	-46
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	48	-18
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	22	10
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	47	-17
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	27	34
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	23	20
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	35	-17
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	46	-8
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	19	0
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	62	-34
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	5	-5

Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	22	-20
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	33	75
Biot-(<i>R</i>)-Phe-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	77	-65
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	39	67
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	65	75
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	83	50
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	80	71
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	83	54
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	22	79
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	22	84
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	12	69
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	25	68
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	76	61
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	57	45
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	66	16
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	32	9
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	18	33
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	34	73
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	26	72
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	41	60
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	54	33
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	46	58
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	61	63
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	64	58
Biot-(<i>S</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	94	65
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	12	-55
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	84	-58
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	87	-55
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	94	-67
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	81	-66
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	97	-67
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	47	-77

Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	57	-65
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	36	-55
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	73	-70
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	88	-71
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	80	-60
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	83	-63
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	97	-60
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	55	-58
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	47	-65
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	88	-44
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	39	-63
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	78	-73
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	92	-65
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	95	-49
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	93	-83
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	83	-73
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	31	46
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	92	63
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	93	62
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	94	60
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	92	58
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	97	63
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	93	74
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	94	70
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	62	58
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	79	59
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	95	54
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	93	58
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	92	60
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	92	67
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	79	40
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	88	72
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	94	60

Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	83	40
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	84	59
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	91	52
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	91	69
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	65	32
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	97	59
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	-	K ₂ CO ₃	DMB	0	0
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	76	-45
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	42	-14
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112V	K ₂ CO ₃	DMB	75	-21
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	85	-76
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112I	K ₂ CO ₃	DMB	90	-44
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	28	-63
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	28	-70
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112W	K ₂ CO ₃	DMB	30	-59
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃	DMB	71	-36
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	51	-41
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112C	K ₂ CO ₃	DMB	23	-48
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	88	-73
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112D	K ₂ CO ₃	DMB	29	-71
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112E	K ₂ CO ₃	DMB	26	-57
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	33	-63
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112K	K ₂ CO ₃	DMB	20	-50
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112R	K ₂ CO ₃	DMB	24	-49
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112N	K ₂ CO ₃	DMB	84	-26
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	68	-59
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	78	-33
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	11	-32
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	46	-70
Biot-4°-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	96	90
Biot-4°-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	96	90
Biot-4°-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	93	90
Biot-4°-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	93	89

Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	97	89
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	97	88
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	90	88
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	98	87
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	94	88
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	98	87
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	98	87
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112G-N118T	K ₂ CO ₃	DMB	93	87
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	97	-32
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	100	-31
Biot-4 ^o -1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112Q	K ₂ CO ₃	DMB	91	-29
Biot-(R)-Phe-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	77	-65
Biot-(S)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	85	74
Biot-(S)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	81	75
Biot-(S)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	78	75
Biot-(S)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112A	K ₂ CO ₃	DMB	79	75
Biot-(S)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	74	82
Biot-(S)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112F	K ₂ CO ₃	DMB	75	80
Biot-(S)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	90	80
Biot-(S)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112Y	K ₂ CO ₃	DMB	85	80
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112G	K ₂ CO ₃	DMB	96	-54
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	95	-82
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	89	-82
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112G-V47G	K ₂ CO ₃	DMB	93	-82
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	98	-69
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	96	-66
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112T	K ₂ CO ₃	DMB	99	-69
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	94	-72
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	90	-72
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	89	-72
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	92	-72
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	84	-72
Biot-(R)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	88	-72

Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	88	-71
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Avi	K ₂ CO ₃	DMB	88	-72
Biot-(<i>S</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112H	K ₂ CO ₃	DMB	99	73
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	66	-74
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112L	K ₂ CO ₃	DMB	65	-75
Biot-(<i>R</i>)-Pip-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	S112M	K ₂ CO ₃	DMB	88	-73
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	NaOH ^[b]	DMB	44	-58
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	NaOH ^[c]	DMB	57	-55
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	NaOH ^[d]	DMB	85	-55
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	NaOH ^[e]	DMB	87	-57
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	NaOH ^[f]	DMB	92	-58
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	Na ₃ PO ₄ ^[b]	DMB	45	-66
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	Na ₃ PO ₄ ^[c]	DMB	64	-64
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	Na ₃ PO ₄ ^[d]	DMB	74	-58
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	Na ₃ PO ₄ ^[e]	DMB	81	-54
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	Na ₃ PO ₄ ^[f]	DMB	74	-54
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	Na ₂ CO ₃ ^[b]	DMB	51	-62
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	Na ₂ CO ₃ ^[c]	DMB	93	-62
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	Na ₂ CO ₃ ^[d]	DMB	96	-65
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	Na ₂ CO ₃ ^[e]	DMB	95	-67
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	Na ₂ CO ₃ ^[f]	DMB	96	-66
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃ ^[b]	DMB	64	-64
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃ ^[c]	DMB	94	-64
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃ ^[d]	DMB	96	-65
Biot-(<i>R</i>)-Pro-1	[PdCl(η^3 -Ph ₂ allyl)] ₂	WT Sav	K ₂ CO ₃ ^[f]	DMB	96	-66

Remarques : ^[a] L'excès énantiomérique > 0 correspond à [R] > [S] et l'excès énantiomérique < 0 correspond à [R] < [S] ; ^[b] Nombre d'équivalents de Base/Substrat = 1 ; ^[c] Nombre d'équivalents de Base/Substrat = 2 ; ^[d] Nombre d'équivalents de Base/Substrat = 3 ; ^[e] Nombre d'équivalents de Base/Substrat = 4 ; ^[f] Nombre d'équivalents de Base/Substrat = 5.

8. Références bibliographiques.

- [1] R. Noyori, *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, New-York, **1994**.
- [2] D. Astruc, *Chimie Organométallique*, EDP Sciences, Grenoble, **2000**.
- [3] E. N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto, *Comprehensive Asymmetric Catalysis*, Springer, Berlin, **1999**.
- [4] I. Ojima, *Catalytic Asymmetric Synthesis*, Wiley-VCH ed., Wiley-VCH, New-York, **2000**.
- [5] J. A. Osborn, F. H. Jardine, J. F. Young, G. Wilkinson, *J. Chem. Soc.* **1966**, 1711.
- [6] H. B. Kagan, *L'actualité chimique* **2003**, 10.
- [7] S. Stinson, *Chem. Eng. News* **2001**, 79, 34.
- [8] A. M. Thayer, *Chem. Eng. news* **2005**, 83, 40.
- [9] H.-U. Blaser, *Chem. Commun.* **2003**, 293.
- [10] H. B. Kagan, T. P. Dang, *J. Chem. Soc.* **1971**, 481.
- [11] H. Nozaki, S. Moriuti, H. Takaya, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1966**, 5239.
- [12] W. S. Knowles, M. J. Sabacky, *Chem. Commun.* **1968**, 1445.
- [13] W. S. Knowles, M. J. Sabacky, B. D. Vineyard, D. J. Weinkauff, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 2567.
- [14] T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5974.
- [15] Y. Gao, J. M. Klunder, R. M. Hanson, H. Masamune, S. Y. Ko, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5765.
- [16] K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2024.
- [17] W. S. Knowles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1998.

- [18] R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008.
- [19] M. Kitamura, T. Ohkuma, S. Inoue, N. Sayo, H. Kumobayashi, S. Akutagawa, T. Ohta, H. Takaya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 629.
- [20] K. Toriumi, T. Ito, H. Takaya, T. Souchi, R. Noyori, *Acta Cryst. Sect. B* **1982**, *38*, 807.
- [21] T. Ohta, H. Takaya, R. Noyori, *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 566.
- [22] S. Feldgus, C. R. Landis, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12714.
- [23] H. Shimizu, I. Nagasaki, T. Saito, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5405.
- [24] S. Inoue, M. Osada, K. Koyano, H. Takaya, R. Noyori, *Chem. Lett.* **1985**, 1007.
- [25] H. Takaya, K. Mashima, K. Koyano, M. Yagi, H. Kumobayashi, T. Taketomi, S. Akutagawa, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 629.
- [26] N. G. Andersen, R. McDonald, B. A. Keay, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 263.
- [27] M. Berthod, G. Mignani, G. Woodward, M. Lemaire, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1801.
- [28] C. Saluzzo, M. Lemaire, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 915.
- [29] T. Dwars, G. Oehme, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 239.
- [30] R. Schmid, M. Cereghetti, B. Heiser, P. Schönholzer, H.-J. Hansen, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 897.
- [31] X. Zhang, K. Mashima, K. Koyano, N. Sayo, H. Kumobayashi, S. Akutagawa, H. Takaya, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7283.
- [32] J. P. Henschke, M. J. Burk, C. G. Malan, D. Herzberg, J. A. Peterson, A. J. Wildsmith, C. J. Copley, G. Casy, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 300.
- [33] N. Yamamoto, M. Murata, T. Morimoto, K. Achiwa, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1085.
- [34] M. Murata, T. Morimoto, K. Achiwa, *Synlett* **1991**, 827.
- [35] R. Schmid, J. Foricher, M. Cereghetti, P. Schönholzer, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 370.

- [36] B. Driessen-Hoelscher, J. Kralik, I. Ritzkopf, C. Steffens, G. Giffels, C. Dreisbach, T. Prinz, W. Lange, *Eur. Pat. Appl.* **2002**, 1 186 609
- [37] Z. Zhang, H. Qian, J. Longmire, X. Zhang, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6223.
- [38] T. Saito, T. Yokozawa, X. Zhang, *Eur. Pat Appl.* **1998**, 850 945.
- [39] C.-C. Pai, Y.-M. Li, Z.-Y. Zhou, A. S. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2789.
- [40] S. Duprat de Paule, S. Jeulin, V. Ratovelomanana-Vidal, J.-P. Genet, N. Champion, P. Dellis, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 823.
- [41] S. Jeulin, S. Duprat de Paule, V. Ratovelomanana-Vidal, J.-P. Genet, N. Champion, P. Dellis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 320.
- [42] F. Leroux, J. Gorecka, M. Schlosser, *Synthesis* **2004**, 326.
- [43] D. E. Metzler, *The Chemical Reactions of Living Cells*, New-York, **1997**.
- [44] L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company ed., W. H. Freeman, New-York, **1995**.
- [45] D. E. Benson, M. S. Wisz, H. W. Hellinga, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, 9, 370.
- [46] K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Nature* **2001**, 409, 232.
- [47] K. Nakamura, R. Yamanaka, T. Matsuda, T. Harada, *Tetrahedron Asym.* **2003**, 14, 2659.
- [48] C. M. Thomas, T. R. Ward, *Appl. Organometal. Chem.* **2005**, 19, 35.
- [49] C. M. Thomas, T. R. Ward, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 337.
- [50] K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. D. Cardayre, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. H. Huisman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3948.
- [51] A. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 548.
- [52] G. DeSantis, Z. Zhu, W. A. Grennberg, K. Wong, J. Chaplin, S. R. Hanson, B. Farwell, L. W. Nicholson, C. R. Rand, D. P. Weiner, D. E. Robertson, M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9024.

- [53] A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron Asym.* **2004**, *15*, 3331.
- [54] M. Edin, J.-E. Bäckvall, A. Còrdova, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7697.
- [55] H. Gröger, W. Hummel, C. Rollmann, F. Chamouleau, H. Hüsken, H. Werner, C. Wunderlich, K. Abokitse, K. Drauz, S. Bulchholz, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 633.
- [56] J. M. Vrtis, A. K. White, W. W. Metcalf, W. A. Van der Donk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3257.
- [57] W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014.
- [58] H. Joo, A. Arizawa, Z. Lin, F. H. Arnold, *Chemistry & Biology* **1999**, *6*, 699.
- [59] K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 709.
- [60] N. J. Turner, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 474.
- [61] R. Chen, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 13.
- [62] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science* **1984**, *226*, 505.
- [63] D. Qi, C.-M. Tann, D. Haring, M. D. Distefano, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3081.
- [64] Y. Lu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 118.
- [65] C. A. Kruithof, M. A. Casado, G. Guillena, M. R. Egmond, A. van der Kerk-van Hoof, A. J. R. Heck, R. J. M. K. Gebbink, G. van Koten, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6869.
- [66] J. R. Carey, S. K. Ma, T. D. Pfister, D. K. Garner, H. K. Kim, J. A. Abramite, Z. Wang, Z. Guo, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10812.
- [67] M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6595.
- [68] L. Panella, J. Broos, J. Jin, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, M. Jeronimus-Stratingh, B. L. Feringa, A. J. Minnaard, J. G. De Vries, *Chem. Commun.* **2005**, 5656.
- [69] B. G. Davis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 379.

- [70] M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1005.
- [71] T. Ueno, T. Koshiyama, M. Ohashi, K. Kondo, M. Kono, A. Suzuki, T. Yamane, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6556.
- [72] A. Mahammed, Z. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2883.
- [73] M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306.
- [74] C.-C. Lin, C.-W. Lin, A. S. C. Chan, *Tetrahedron Asym.* **1999**, *10*, 1887.
- [75] T. R. Ward, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3798.
- [76] G. Klein, N. Humbert, J. Gradinaru, A. Ivanova, F. Gilardoni, U. E. Rusbandi, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7764.
- [77] J. Collot, J. Gradinaru, N. Humbert, M. Skander, A. Zocchi, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9030.
- [78] M. Skander, N. Humbert, J. Collot, J. Gradinaru, G. Klein, A. Loosli, J. Sauser, A. Zocchi, F. Gilardoni, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411.
- [79] M. Skander, C. Malan, A. Ivanova, T. R. Ward, *Chem. Commun.* **2005**, 4815.
- [80] C. Letondor, N. Humbert, T. R. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, *102*, 4683.
- [81] C. Letondor, A. Pordea, N. Humbert, A. Ivanova, S. Mazurek, M. Novic, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8320.
- [82] N. M. Green, *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 85.
- [83] Y. Eisenberg-Domovich, Y. Pazy, O. Nir, B. Raboy, E. A. Bayer, M. Wilchek, O. Livnah, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5916.
- [84] L. Chaiet, F. J. Wolf, *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *106*, 1.
- [85] P. Gyorgy, C. S. Rose, K. Hofmann, D. B. Melville, V. D. Vigneau, *Science* **1940**, *92*, 609.

- [86] O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5076.
- [87] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 1.
- [88] P. C. Weber, J. J. Wendoloski, M. W. Pantoliano, F. R. Salemme, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3197.
- [89] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4872.
- [90] Y. Pazy, T. Kulik, E. A. Bayer, M. Wilchek, O. Livnah, *J. Biol. Chem.* **2002**, *227*, 30892.
- [91] S. Freitag, I. L. Trong, L. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1157.
- [92] N. M. Green, *Biochem. J.* **1966**, *101*, 774.
- [93] B. M. Trost, M. L. Crawley, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2921.
- [94] U. Leutenegger, G. Umbrecht, C. Fahrni, P. v. Matt, A. Pfaltz, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *48*, 2143.
- [95] B. M. Trost, M. R. Machacek, A. Aponick, *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 747.
- [96] J. C. Fiaud, L. Y. Legros, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1907.
- [97] S. A. Godleski, *Organometallics* **1984**, *3*, 21.
- [98] B. M. Trost, T. J. Dietsche, T. J. Fullerton, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 737.
- [99] G. Helmchen, A. Pfaltz, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 336.
- [100] J. P. Collman, L. S. Hegedus, J. R. Norton, R. G. Finke, *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry*, University Science Books: Mill Valley, Ca, **1987**.
- [101] B. Akermark, K. Zetterberg, S. Hansson, B. Krakenberger, A. Vitagliano, *J. Organomet. Chem.* **1987**, *335*, 133.
- [102] G. M. Whitesides, *Small* **2005**, *1*, 172.

- [103] D. H. Bamford, *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 558.
- [104] R. F. Service, *Science* **2002**, *298*, 2322.
- [105] R. P. Feynman, M. Gell-Mann, *Physic. Rev.* **1958**, *109*, 193.
- [106] <http://www.nanotechproject.org/>.
- [107] A. M. Baro, R. Miranda, J. Alaman, N. Garcia, G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, J. L. Carrascosa, *Nature* **1985**, *315*, 253.
- [108] G. Binnig, C. Gerber, E. Stoll, T. R. Albrecht, C. F. Quate, *Europhys. Lett.* **1987**, *3*, 1281.
- [109] N. W. Ockwig, O. Delgado-Friedrichs, M. O'Keeffe, O. M. Yaghi, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 176.
- [110] P. M. Zorkii, P. N. Oleinikov, *J. Struct. Chem.* **2001**, *42*, 24.
- [111] R. Banerjee, A. Phan, B. Wang, C. Knobler, H. Furukawa, M. O'Keeffe, O. M. Yaghi, *Science* **2008**, *319*, 939.
- [112] J. Yang, M. Mayer, J. K. Kriebel, P. Garstecki, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1555.
- [113] A. J. Haes, R. P. v. Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10596.
- [114] D. L. Feldheim, C. A. Foss, *Metal Nanoparticules: Synthesis, Characterization and Applications*, Marcel Dekker, New-York, **2002**.
- [115] A. Kiriy, S. Minko, G. Gorodyska, M. Stumm, *Nanolett.* **2002**, *2*, 881.
- [116] K. J. Klabunde, *Nanoscale Materials in Chemistry*, Wiley, New-York, **2001**.
- [117] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607.
- [118] W. Shenton, S. A. Davis, S. Mann, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 449.
- [119] M. Kitamura, T. Ohkuma, H. Takaya, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1555.
- [120] R. Noyori, M. Kitamura, in *Modern Synthetic Methods Vol. 5, Vol. 5* (Ed.: R. Scheffold), Springer Verlag, Berlin, **1989**.

- [121] S. Jeulin, S. D. De Paule, V. Ratovelomanana-Vidal, J.-P. Gênet, N. Champion, P. Dellis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5799.
- [122] J. Madec, X. Pfister, P. Phansavath, V. Ratovelomanana-Vidal, J. P. Gênet, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2563.
- [123] H.-P. Buser, F. Spindler, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 2451.
- [124] A. Togni, C. Breutel, A. Schnyder, F. Spindler, H. Landert, A. Tijani, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4062.
- [125] T. Imamoto, T. Oshiki, T. Onosawa, T. Kusumoto, K. Sato, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5244.
- [126] T. Ireland, K. Tappe, G. Grossheimann, P. Knochel, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 843.
- [127] Y.-G. Zhou, W. Tang, W.-B. Wang, W. Li, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4952.
- [128] K. Junge, B. Hagemann, S. Enthaler, G. Oehme, M. Michalik, A. Monsees, T. Riermeier, U. Dingerdissen, M. Beller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5066.
- [129] B. Pugin, P. Martin, M. Mueller, F. Naud, F. Spindler, M. Thommen, G. Melone, M. Kesselgruber, (Solvias Ag, Switz.). Application: WO, **2004**, p. 71 pp.
- [130] M. Bulliard, B. Laboue, S. Roussiase, (PPG-Sipsy, Fr.). Application: WO, **2002**, p. 43 pp.
- [131] M. Raghunath, X. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8213.
- [132] M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8518.
- [133] M. T. Reetz, T. Sell, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6333.
- [134] M. T. Reetz, G. Mehler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3889.
- [135] L. A. Arnold, R. Imbos, A. Mandoli, A. H. M. De Vries, R. Naasz, B. L. Feringa, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2865.

- [136] M. van den Berg, A. J. Minnaard, E. P. Schudde, J. van Esch, A. H. M. de Vries, J. G. de Vries, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11539.
- [137] A. Gillon, K. Heslop, D. J. Hyett, A. Martorell, A. G. Orpen, P. G. Pringle, C. Claver, E. Fernandez, *Chem. Commun.* **2000**, 961.
- [138] M. Ostermeier, J. Priess, G. Helmchen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 612.
- [139] L. Tenud, R. Blum, (Lonza A.-G., Switz.). Application: EP, **1982**, p. 13 pp.
- [140] <http://www.lonza.com/>.
- [141] H. Jick, G. L. Zornberg, S. S. Jick, S. Seshadri, D. A. Drachman, *Lancet* **2000**, *356*, 1627.
- [142] J. N. Poynter, S. B. Gruber, P. D. Higgins, R. Almog, J. D. Bonner, H. S. Rennert, M. Low, J. K. Greenson, G. Rennert, *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 2184.
- [143] V. A. Pavlov, E. V. Starodubtseva, M. G. Vinogradov, V. A. Ferapontov, O. R. Malyshev, G. L. Heise, *Russ. Chem. Bull.* **2000**, *49*, 728.
- [144] J. Wu, H. Chen, Z.-Y. Zhou, C. H. Yeung, A. S. C. Chan, *Synlett* **2001**, 1050.
- [145] L. Qiu, J. Wu, S. Chan, T. T. L. Au-Yeung, J.-X. Ji, R. Guo, C.-C. Pai, Z. Zhou, X. Li, Q.-H. Fan, A. S. C. Chan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5815.
- [146] J. Wu, H. Chen, W. H. Kwok, K. H. Lam, Z. Y. Zhou, C. H. Yeung, A. S. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1539.
- [147] L. Qiu, J. Qi, C.-C. Pai, S. Chan, Z. Zhou, M. C. K. Choi, A. S. C. Chan, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4599.
- [148] B. Jiang, J.-F. Liu, S.-Y. Zhao, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2376.
- [149] D. Liu, W. Li, X. Zhang, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2181.
- [150] J.-P. G net, A. Marinetti, G. Michaud, M. Bulliard, (PPG-Sipsy, Fr.). Application: WO, **2002**, p. 56 pp.
- [151] M. J. Burk, T. G. P. Harper, C. S. Kalberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4423.

- [152] A. Marinetti, J.-P. Genet, S. Jus, D. Blanc, V. Ratovelomanana-Vidal, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1160.
- [153] O. Labeeuw, C. Roche, P. Phansavath, J.-P. Gênet, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 105.
- [154] T. Imamoto, M. Nishimura, A. Koide, K. Yoshida, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7413.
- [155] G. M. Whitesides, D. W. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6979.
- [156] M. Shibasaki, E. M. Vogl, T. Ohshima, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 1533.
- [157] O. Baudoin, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4223.
- [158] K. U. Wendt, G. E. Schulz, E. J. Corey, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2812.
- [159] B. M. Trost, *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 385.
- [160] J. Tsuji, *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 144.
- [161] P. Brandt, P. Roth, P. G. Andersson, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4885.
- [162] A. Togni, U. Burckhardt, V. Gramlich, P. S. Pregosin, R. Salzmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1031.
- [163] M. D. Toscano, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3212.
- [164] T. Ueno, T. Koshiyama, S. Abe, N. Yokoi, M. Ohashi, H. Nakajima, Y. Watanabe, *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 142.
- [165] C. Letondor, T. R. Ward, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1845.
- [166] Y. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5588.
- [167] G. DeSantis, J. B. Jones, *Curr. Opin. Biotech.* **1999**, *10*, 324.
- [168] M. Creus, T. R. Ward, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1835.
- [169] A. Loosli, U. E. Rusbandi, J. Gradinaru, K. Bernauer, C. W. Schlaepfer, M. Meyer, S. Mazurek, M. Novic, T. R. Ward, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 660.
- [170] R. R. Davies, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11643.

- [171] T. Sugimoto, T. Kokubo, J. Miyazaki, S. Tanimoto, M. Okano, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 402.
- [172] A. Fernandez-Gacio, A. Codina, J. Fastrez, O. Riant, P. Soumillion, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1013.
- [173] K. Okrasa, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 1587.
- [174] F. van de Velde, L. Konemann, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Chem. Commun.* **1998**, 1891.
- [175] J. Collot, N. Humbert, M. Skander, G. Klein, T. R. Ward, *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4868.
- [176] M. T. Reetz, J. J.-P. Peyeralans, A. Maichele, Y. Fu, M. Maywald, *Chem. Commun.* **2006**, 4318.
- [177] H. Yamaguchi, T. Hirano, H. Kiminami, D. Taura, A. Harada, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 3571.
- [178] U. E. Rusbandi, C. Lo, M. Skander, A. Ivanova, M. Creus, N. Humbert, T. R. Ward, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1923.
- [179] G. Roelfes, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3230.
- [180] G. Roelfes, A. J. Boersma, B. L. Feringa, *Chem. Commun.* **2006**, 635.
- [181] M. T. Reetz, N. Jiao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2416.
- [182] Y. Lu, *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 9930.
- [183] G. Roelfes, *Mol. Biosyst.* **2007**, 3, 126.
- [184] D. Coquiere, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9308.
- [185] U. S. Schubert, C. Eschbaumer, O. Hien, P. R. Andres, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 4705.
- [186] T. R. Ward, J. Collot, J. Gradinaru, A. Loosli, M. Skander, C. Letondor, E. Joseph, G. Klein, *Chimia* **2003**, 57, 586.

- [187] C. Rabeyrin, C. Nguiefack, D. Sinou, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7461.
- [188] N. Humbert, A. Zocchi, T. R. Ward, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 47.
- [189] C. Rabeyrin, D. Sinou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3891.
- [190] G. Ferey, C. Mellot-Draznieks, C. Serre, F. Millange, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 217.
- [191] S.-i. Nishikiori, H. Yoshikawa, Y. Sano, T. Iwamoto, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 227.
- [192] P. D. W. Boyd, C. A. Reed, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 235.
- [193] P. J. Steel, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 243.
- [194] S. Lee, A. B. Mallik, Z. Xu, E. B. Lobkovsky, L. Tran, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 251.
- [195] M. H. Bartl, S. W. Boettcher, K. L. Frindell, G. D. Stucky, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 263.
- [196] D. Bradshaw, J. B. Claridge, E. J. Cussen, T. J. Prior, M. J. Rosseinsky, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 273.
- [197] K. S. Suslick, P. Bhyrappa, J. H. Chou, M. E. Kosal, S. Nakagaki, D. W. Smithenry, S. R. Wilson, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 283.
- [198] P. Feng, X. Bu, N. Zheng, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 293.
- [199] B. Hatton, K. Landskron, W. Whitnall, D. Perovic, G. A. Ozin, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 305.
- [200] M. W. Hosseini, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 313.
- [201] L. M. C. Beltran, J. R. Long, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 325.
- [202] R. J. Hill, D.-L. Long, N. R. Champness, P. Hubberstey, M. Schroeder, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 335.
- [203] D. Fiedler, D. H. Leung, R. G. Bergman, K. N. Raymond, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 349.
- [204] M. G. Kanatzidis, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 359.
- [205] M. Fujita, M. Tominaga, A. Hori, B. Therrien, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 369.

- [206] O. R. Evans, W. Lin, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 511.
- [207] S. Kitagawa, R. Kitaura, S.-i. Noro, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2334.
- [208] T. Scheibel, R. Parthasarathy, G. Sawicki, X.-M. Lin, H. Jaeger, S. L. Lindquist, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4527.
- [209] T. Scheibel, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 427.
- [210] T. Douglas, M. Young, *Science* **2006**, *312*, 873.
- [211] T. Ueno, M. Suzuki, T. Goto, T. Matsumoto, K. Nagayama, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2527.
- [212] D. Moll, C. Huber, B. Schlegel, D. Pum, U. B. Sleytr, M. Sara, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14646.
- [213] W. Shenton, D. Pum, U. B. Sleytr, S. Mann, *Nature* **1997**, *389*, 585.
- [214] U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sara, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1034.
- [215] B. M. Rabatic, R. C. Claussen, S. I. Stupp, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 5877.
- [216] Q. Wang, T. Lin, L. Tang, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 459.
- [217] R. M. Kramer, C. Li, D. C. Carter, M. O. Stone, R. R. Naik, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13282.
- [218] F. P. Seebeck, K. J. Woycechowsky, W. Zhuang, J. P. Rabe, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4516.
- [219] W. Shenton, S. Mann, H. Colfen, A. Bacher, M. Fischer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 442.
- [220] M. G. Ryadnov, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 969.
- [221] J. E. Padilla, C. Colovos, T. O. Yeates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 2217.
- [222] K. Matsuura, K. Murasato, N. Kimizuka, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10148.

- [223] C. T. Carlson Jonathan, S. Jena Sidhartha, M. Flenniken, T.-f. Chou, A. Siegel Ronald, R. Wagner Carston, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7630.
- [224] P. Ringler, G. E. Schulz, *Science* **2003**, *302*, 106.
- [225] X. Gao, H. Matsui, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2037.
- [226] C. Mao, D. J. Solis, B. D. Reiss, S. T. Kottmann, R. Y. Sweeney, A. Hayhurst, G. Georgiou, B. Iverson, A. M. Belcher, *Science* **2004**, *303*, 213.
- [227] D. S. Wilbur, P. M. Pathare, D. K. Hamlin, S. A. Weerawarna, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 819.
- [228] D. S. Wilbur, D. K. Hamlin, K. R. Buhler, P. M. Pathare, R. L. Vessella, P. S. Stayton, R. To, *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 322.
- [229] J. Hamblett Kevin, B. Kegley Brian, K. Hamlin Don, M.-K. Chyan, E. Hyre David, W. Press Oliver, D. S. Wilbur, S. Stayton Patrick, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 588.
- [230] F. Monnard, Stage de 3ème année, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, **2006**.
- [231] D. S. Wilbur, D. K. Hamlin, P. M. Pathare, S. A. Weerawarna, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 572.
- [232] G. N. Ramachandran, G. Kartha, *Nature* **1954**, *174*, 269.
- [233] J. Pierron, C. Malan, M. Creus, J. Gradinaru, I. Hafner, A. Ivanova, A. Sardo, R. Ward Thomas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 701.
- [234] S. Burazerovic, J. Gradinaru, J. Pierron, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5510.
- [235] P. Bottari, R. Aebersold, F. Turecek, M. H. Gelb, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 380.
- [236] P. R. Auburn, P. B. Mackenzie, B. Bosnich, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2033.