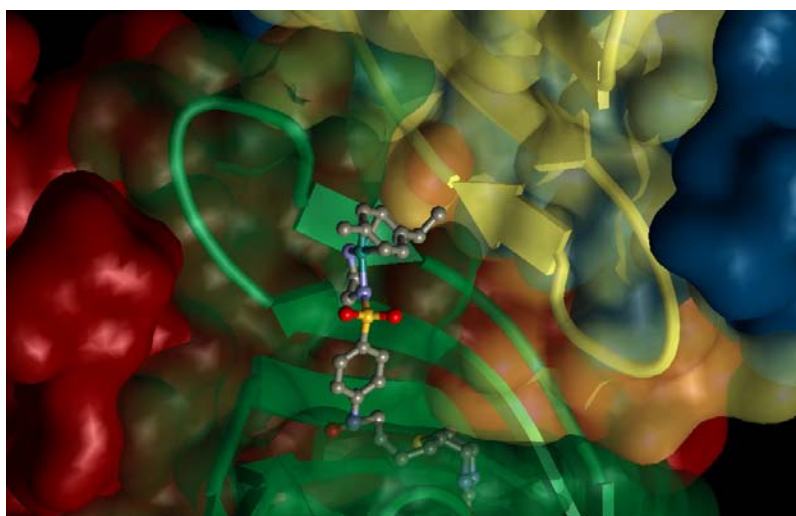


Thèse de Doctorat

**CRÉATION DE MÉTALLOENZYMES ARTIFICIELLES
BASÉES SUR LA TECHNOLOGIE BIOTINE – AVIDINE
POUR LA RÉDUCTION ASYMÉTRIQUE DE DÉRIVÉS
CARBONYLÉS PAR TRANSFERT HYDROGÉNANT**



Christophe Letondor

- Mai 2006 -

Thèse soutenue le 24 mai 2006 devant le jury composé par :

Prof. Thomas R. Ward, Directeur de thèse, Université de Neuchâtel, Suisse

Prof. Marc Fontecave, Université de Grenoble – CEA, France

Prof. Kay Severin, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Suisse

Prof. Robert Deschenaux, Université de Neuchâtel, Suisse

Mots Clés : métalloenzymes artificielles, catalyse asymétrique, transfert hydrogénant, réduction de cétones, complexes organométalliques, biotine – (strept)avidine, protéine.

Keywords: artificial metalloenzymes, asymmetric catalysis, transfer hydrogenation, ketones reduction, organometallic complexes, biotin – (strept)avidin, protein.

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Création de Métalloenzymes Artificielles Basées sur la Technologie Biotine – Avidine pour la Réduction Asymétrique de Dérivés Carbonylés par Transfert Hydrogénant

Christophe LETONDOR

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. Deschenaux, K. Severin (EPF Lausanne)
et M. Fontecave (Grenoble F)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 30 mai 2006

Le doyen :

J.-P. Derendinger

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
REMERCIEMENTS	6
ABSTRACT.....	7
RÉSUMÉ	9
- CHAPITRE I - INTRODUCTION	11
1. La catalyse homogène	11
1.1. Considérations générales	11
1.2. La catalyse asymétrique et la chiralité	12
1.2.1. Les ligands phares : historique et évolution	14
1.2.1.1. <i>Influence de la première sphère de coordination</i>	15
1.2.1.2. <i>Influence de la seconde sphère de coordination</i>	16
1.2.2. Approche combinatoire.....	16
1.3. Réduction énantiosélective des dérivés carbonylés	18
1.3.1. L'hydrogénation par le BINAP et ses dérivés.....	19
1.3.2. Le transfert hydrogénant	20
1.3.2.1. <i>Sources d'hydrures et aspects mécanistiques</i>	21
1.3.2.2. <i>Les différents systèmes et leurs ligands</i>	24
1.3.3. Comparaison entre hydrogénation et transfert hydrogénant	27
1.4. Résolution cinétique.....	28
1.4.1. Principes et exemples.....	28
1.4.2. Résolution cinétique par transfert hydrogénant : réaction micro-réversible	29
2. Les Protéines.....	31
2.1. Considérations générales	31
2.1.1. Les différents types de protéines : relation structure – activité	31
2.1.2. La catalyse enzymatique	32
2.2. Les applications de la catalyse enzymatique	33
2.2.1. Utilisation de systèmes biologiques non modifiés (catégorie 1).....	34
2.2.2. Adaptation des systèmes existants par mutagenèse (catégorie 2)	36

2.2.3. Génération de systèmes compatibles (catégorie 3)	38
2.2.3.1. <i>Les anticorps catalytiques</i>	38
2.2.3.2. <i>Les métalloenzymes artificielles</i>	41
2.3. Système biotine – (strept)avidine.....	45
2.3.1. Structure tridimensionnelle	46
2.3.2. Avidine et streptavidine : homologues et différences	47
2.3.3. Ancrage de la biotine : réseau de liaisons hydrogènes	49
3. Le but de la thèse.....	51
- CHAPITRE II - RESULTATS & DISCUSSION.....	53
1. Le système catalytique.....	53
1.1. Synthèse et évaluation des différents ligands et complexes	53
1.1.1. Ligands de type amino-sulfonamide.	53
1.1.2. Ligand de type bipyridine	56
1.1.3. Comparaison entre les deux types de complexes	57
1.2. La catalyse en présence de protéine : conditions de réaction	58
1.2.1. Sources d'hydrures.....	59
1.2.2. Influence de la concentration de formiate sur la catalyse.....	61
1.2.3. Influence du pH sur la catalyse	64
1.3. Protocole du transfert hydrogénéant par les métalloenzymes artificielles	66
1.3.1. Quantification des sites actifs des protéines hôtes	66
1.3.2. Mise en œuvre de la catalyse	67
2. Première évolution chimique et génétique.....	69
2.1. Diversité chimique	70
2.2. Diversité génétique	72
2.3. Optimisation des conditions réactionnelles et variation des substrats	78
2.3.1. Température et dénaturation	78
2.3.2. Effet des solvants organiques sur la catalyse	79
2.3.3. Variation des substrats	81
2.4. Méthode de suivie de la conversion par RMN ¹⁹ F.....	83
2.5. Origine de la sélectivité	86
2.5.1. Hypothèse sur les mécanismes énantiosélectifs	87
2.5.2. Détermination de la configuration du métal dans la protéine.....	88

3. Vers une approche rationnelle du site actif	90
3.1. Stratégie et localisation du site actif	91
3.1.1. Visualisation du site actif par le « docking »	91
3.1.2. La stratégie du criblage	95
3.2. Le criblage des complexes	99
3.3. Le criblage des protéines	102
3.4. Le criblage des substrats	107
3.5. Considérations mécanistiques	110
3.6. Exploration du loop 7-8	115
4. Ouverture vers le criblage à haut débit	119
4.1. Méthode ELISA pour un criblage des catalyseurs par des anticorps.....	120
4.1.1. Principe du dosage immunologique compétitif.....	120
4.1.2. Le criblage des métalloenzymes artificielles	122
4.2. Validation de la méthode aux anticorps pour les enzymes artificielles	126
- CHAPITRE III – CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	128
- CHAPITRE IV - MATERIEL & METHODES	131
1. Abréviations et glossaire.....	131
2. Réactifs et solvants.....	133
3. Appareillages	134
3.1. Dichroïsme circulaire : CD	134
3.2. Résonance magnétique nucléaire : RMN (NMR).....	135
3.3. Chromatographie liquide : HPLC	135
3.4. Chromatographie gazeuse : GC	135
3.5. Spectrométrie de masse : MS.....	135
4. Experimental procedure for the synthesis of the d6-piano stool complexes incorporating biotinylated ligands Biot-<i>q</i>-LH (<i>q</i> : <i>ortho</i>, <i>meta</i>, <i>para</i>).....	136
4.1. <i>N</i> -BOC-ethylenediamine : (1).....	136

4.2. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(<i>q</i> -Nitrophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (2).....	136
4.2.1. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(4-Nitrophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (<i>para</i>).....	136
4.2.2. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(3-Nitrophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (<i>meta</i>)	137
4.2.3. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(2-Nitrophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (<i>ortho</i>).....	137
4.3. <i>N,N</i> -Dimethyl- <i>N'</i> -(4-nitrophenylsulfonyl)-ethylenediamine :.....	138
4.4. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(<i>q</i> -Aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (3).....	138
4.4.1. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(4-Aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (<i>para</i>)	138
4.4.2. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(3-Aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (<i>meta</i>).....	139
4.4.3. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(2-Aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (<i>ortho</i>).....	139
4.5. <i>N,N</i> -Dimethyl- <i>N'</i> -(4-aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine	139
4.6. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(<i>q</i> -Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (4)	140
4.6.1. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(4-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (<i>para</i>)	140
4.6.2. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(3-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (<i>meta</i>)	141
4.6.3. <i>N</i> -BOC- <i>N'</i> -(2-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (<i>ortho</i>)	141
4.7. <i>N,N</i> -Dimethyl- <i>N'</i> -(4-biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine: Biot- <i>p</i> -LMe ₂ (22).....	142
4.8. <i>N'</i> -(<i>q</i> -Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : Biot- <i>q</i> -LH (5).....	143
4.8.1. <i>N'</i> -(4-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : Biot-<i>p</i>-LH	143
4.8.2. <i>N'</i> -(3-(+)-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : Biot-<i>m</i>-LH	144
4.8.3. <i>N'</i> -(2-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : Biot-<i>o</i>-LH	144
5. General procedure for the synthesis of $[\eta^n-(C_nR_n)M(\text{Biot-L})X]$ (6) and (22).....	145
5.1. Synthesis of $[\eta^6-(C_nR_n)Ru(\text{Biot-}q\text{-L})Cl]$	145
5.2. Synthesis of $[\eta^5-(C_5Me_5)M(\text{Biot-}q\text{-L})Cl]$	147
5.3. General procedure for the synthesis of $[\eta^6-(C_6Me_6)Ru(\text{Biot-bipy})H_2O]^{2+}$ (7)	147
6. Experimental procedure for the catalytic asymmetric transfer hydrogenation	148
6.1. General Procedure for the Asymmetric Transfer Hydrogenation.....	148
6.2. Detailed Protocol for the Asymmetric Transfer Hydrogenation with the Substrate Cocktail containing (8a), (8b) and (8c).....	149
6.3. Detailed Protocol for the Asymmetric Transfer Hydrogenation with the Substrate Cocktail containing (14) and (16) or the Substrate Cocktail containing (18) and (20).	149

6.4. Detailed Protocol for the Asymmetric Transfer Hydrogenation with single substrates	150
7. Analytical Data for the Reduction Products	150
7.1. 1-phenylethanol (9a)	151
7.2. 1-(<i>p</i> -bromophenyl)ethanol (9b)	151
7.3. 1-(<i>p</i> -methylphenyl)ethanol (9c)	151
7.4. 1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthol (13)	151
7.5. α -Methyl-2-pyridinemethanol (15).....	152
7.6. 1-Phenyl-2-butanol (17).....	152
7.7. 4-Phenyl-2-butanol (19).....	152
7.8. 4-Benzyloxy-2-butanol (21).....	152
8. Docking procedure using Autodock 3.0.5.....	152
9. Références bibliographiques.....	154
10. Annexes : Figures supplémentaires.....	163

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le professeur Thomas Ward pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant ces trois années et demi et pour m'avoir donné la chance de travailler sur ce projet passionnant. Je le remercie également pour sa confiance et son soutien ainsi que pour l'ensemble des connaissances qu'il m'a apportées.

Je remercie sincèrement les membres du jury d'avoir accepté de lire et de juger ce travail. A ce titre, je remercie le professeur Marc Fontecave, le professeur Kay Severin, le professeur Robert Deschenaux et le professeur Thomas Ward.

J'adresse mes meilleurs sentiments à tous les étudiants et apprentis avec qui j'ai eu l'occasion de travailler 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 qui a largement contribué à ce travail ainsi que Nicolas Humbert pour la partie biologique.

J'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes amis de Neuchâtel (collègues ou non) pour toutes ces agréables soirées et nos franches rigolades ainsi que pour leur réconfort.

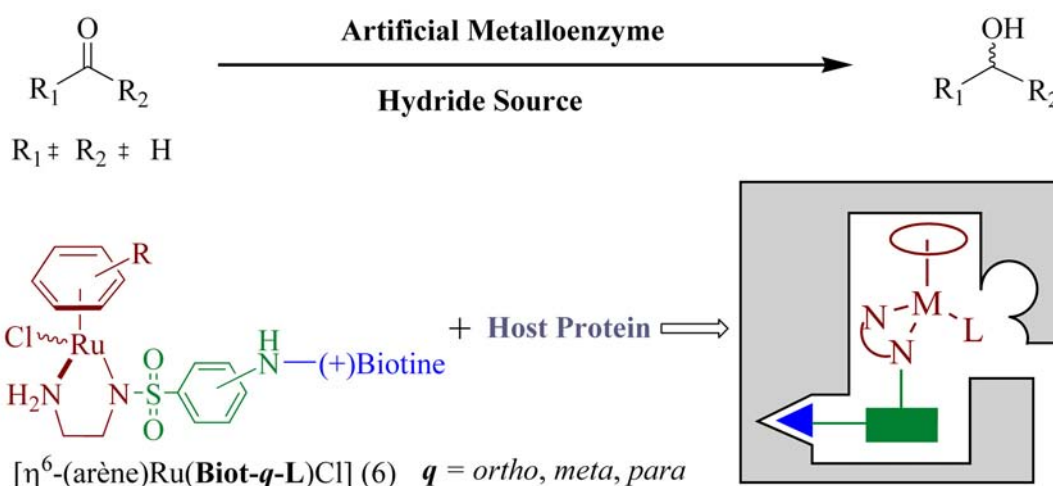
J'aimerais témoigner toute ma gratitude envers mes parents et mes frères sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Je remercie également ma famille et ma belle-famille pour leurs encouragements.

Enfin j'aimerais remercier ma bien-aimée, Madelyne, pour son amour, son soutien et sa patience tout au long de ce parcours. Elle a toujours su m'aider et m'encourager. Je lui dédie cette thèse, à laquelle elle a largement contribué à sa manière.

ABSTRACT

Homogenous- and enzymatic catalysis are in many respects complementary for the synthesis of enantiopure compounds. As the subtle details that govern chiral discrimination are difficult to predict, improving the performance of such catalysts often relies on trial-and-error procedures. Homogenous catalysts are optimized by chemical modification of the first coordination sphere and enzymes can be improved by modification of gene encoding the protein.

The supramolecular anchoring of a biotinylated organometallic catalyst into a host protein ((Strept)avidin) affords versatile artificial metalloenzymes for the reduction of ketones by transfer hydrogenation.



A first chemogenetic optimisation allows us to identify highly selective hybrid catalysts for the asymmetric reduction of carbinols. The artificial metalloenzyme $[\eta^6-(p\text{-cymene})Ru(\text{Biot-}p\text{-L})Cl] \subset \text{P64G}$ affords the 1-(4-methylphenyl)ethanol with up to 94 % ee.

In order to get more insight into the catalytic site, a saturation mutagenesis is performed at the position 112 of streptavidin. This choice for the second genetic optimisation round is suggested by docking studies which reveal that this position lies closest to the biotinylated metal upon incorporation into streptavidin. This screening of

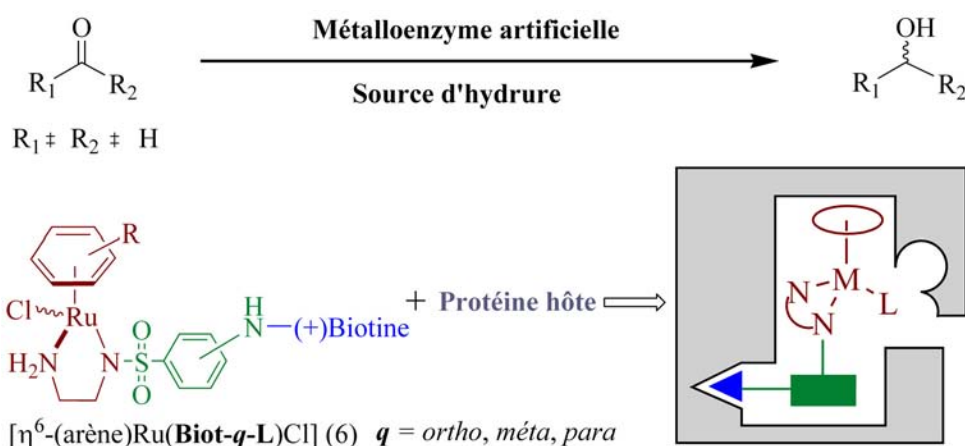
nineteen mutants combined with twenty-one biotinylated complexes affords enantioenriched alcohols in up to 97 % ee (*R*) or 84 % (*S*). Based on these results, we suggest that the enantioselection is mostly dictated by CH- π interactions between the substrate and the η^6 -bond arene. However, in many cases, these complex – protein interactions can be outweighed by substrate – protein interactions to afford the opposite enantiomers of products, especially in the presence of cationic residues.

Combined with a chemical optimisation, the mutagenesis techniques allow to create a large library of hybrid catalysts. As a preliminary test, in order to get a maximum of benefits of this powerful combinatorial approach, the artificial metalloenzyme technology is associated with high throughput screening of enantioselective catalysts by immunoassay.

RÉSUMÉ

La catalyse homogène et la catalyse enzymatique sont complémentaires par bien des aspects. Comme les mécanismes de discrimination énantiosélectifs sont issus d'interactions subtiles et difficiles à prévoir, l'amélioration des performances de ces catalyseurs résultent le plus souvent d'une succession d'essais. Les catalyseurs homogènes sont optimisés chimiquement, tandis que les enzymes sont implémentées par des modifications du génome qui code la protéine.

L'ancrage supramoléculaire d'un complexe organométallique biotinylé dans une protéine hôte ((strept)avidine) permet la création de métalloenzymes artificielles efficaces pour la réduction asymétrique de cétones par transfert hydrogénant.



Une première optimisation chimio – génétique nous a permis d'identifier un catalyseur hybride hautement sélectif pour la réduction de carbinols. L'enzyme artificielle $[\eta^6-(p\text{-cymène})Ru(\text{Biot-}p\text{-L})Cl] \subset \text{P64G}$ produit le 1-(4-méthylphényl)éthanol avec 94 % ee.

Dans le but d'obtenir des informations sur le site catalytique, la technique de mutagenèse par saturation est entreprise à la position 112. Le choix de cette position, pour la seconde optimisation génétique, est suggéré par des expériences de « docking » qui positionnent le métal à proximité de cet acide aminé, quand le complexe

organométallique est ancré dans la streptavidine. Le criblage de dix-neuf mutants de la streptavidine, combinés avec vingt-et-un complexes biotinylés permet d'obtenir des alcools chiraux avec un degré de pureté optique allant jusqu'à 97 % ee (*R*) et 84 % ee (*S*). Basé sur ces résultats, nous proposons que la sélectivité est principalement dictée par une interaction CH- π entre le ligand η^6 -arène du complexe organométallique et le substrat. Toutefois dans certains cas, ces interactions complexe – substrat peuvent être contrebalancées par les interactions protéine – substrat afin de fournir l'énantiomère opposé, en particulier dans le cas des résidus cationiques en position 112.

Combiné à une optimisation chimique, les techniques de mutagenèse permettent de générer une grande librairie de catalyseurs hybrides. Afin de tirer le meilleur parti de ces possibilités d'optimisation, les métalloenzymes artificielles sont associées à un criblage immunologique à haut débit permettant de quantifier la conversion et la sélectivité grâce à des anticorps énantiospécifiques.

- CHAPITRE I -

INTRODUCTION

1. La catalyse homogène

Par définition, la présence d'un catalyseur permet d'accélérer une transformation chimique. Introduit en quantité très inférieure à la stœchiométrie, il est souvent retrouvé intact en fin de réaction. La catalyse homogène, par opposition à la catalyse hétérogène, implique que les réactifs et le catalyseur se trouvent dans la même phase. Par extension, « catalyse homogène » sous-entend que le catalyseur est soluble dans le milieu réactionnel, le plus souvent en phase liquide.

1.1. Considérations générales

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

Il existe différents types de catalyses. La plus simple, de type acide ou basique, est classiquement rencontrée en synthèse organique pour l'acétalisation des dérivés carbonyles ou encore l'hydrolyse des esters. La catalyse enzymatique, qui emploie une à plusieurs macromolécules, est certainement une des plus complexes.^[1, 3] 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.^[1, 4, 5]

Au début des années 1960, la découverte de liaisons multiples carbone-métal avec notamment les carbènes de Fischer (figure I.1.1 a)) conduit à la métathèse des oléfines.^[6] Puis Vaska^[7] découvre un complexe qui permet l'addition oxydante de composés tels que O₂ ou H₂ (figure I.1.1 b)). Cette découverte amène Wilkinson^[8] à développer un catalyseur organométallique capable d'hydrogéner les oléfines (figure I.1.1 c)). Depuis, la catalyse organométallique est en plein essor.

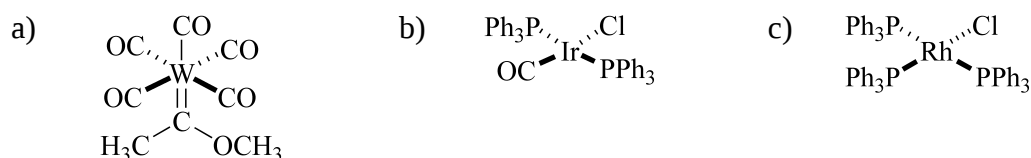


Figure I. 1.1 : a) Carbène stabilisé de Fischer. b) Complexe de Vaska. c) Complexe de Wilkinson-Osborn.

1.2. La catalyse asymétrique et la chiralité

La chiralité est la propriété que possède une molécule de ne pas être superposable à son image dans un miroir, appelée énantiomère. La condition de chiralité d'une molécule est sa dissymétrie, qui peut être un centre de chiralité (centre asymétrique), un axe de chiralité ou un plan de chiralité. Le mélange équimolaire de deux énantiomères constitue un mélange racémique.

Que ce soit dans le domaine agroalimentaire, des matériaux ou de l'industrie pharmaceutique, un grand nombre de molécules cibles de structure complexe possède un ou plusieurs centres asymétriques.^[5] Bien que la majorité des principes actifs soient encore synthétisés et vendus en mélange racémique, la F.D.A. (Food and Drug Administration) impose désormais des études biologiques poussées sur chaque énantiomère mis sur le marché.^[9] 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 »).^[10] 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.^[11] Il est donc indispensable de disposer de techniques appropriées pour synthétiser ces molécules ainsi que leurs intermédiaires chiraux

Knowles.^[15] Sharpless^[16] découvre l'époxydation asymétrique des alcools allyliques, très utilisée en synthèse organique.^[17, 18] Ces travaux sur l'oxydation lui vaudront le prix Nobel en 2001 conjointement à Knowles^[19] et Noyori^[20] pour leurs travaux en hydrogénation asymétrique.

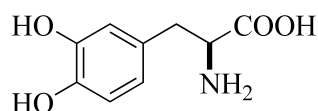


Figure I. 1.3 : (S)-DOPA (anti-Parkinson) issue de la première application industrielle recourant à la catalyse énantiosélective.

1.2.1. Les ligands phares : historique et évolution

La combinaison « métal - ligand » est le facteur clef pour obtenir un catalyseur énantiosélectif performant.^[5] Son efficacité se mesure à la fois par sa réactivité (TON, TOF : voir abréviations et glossaire) et par sa sélectivité ($ee = 100 \times ([R] - [S]) / ([R] + [S])$). La sélectivité étant induite par le ligand, de nombreux groupes de recherche investissent leurs efforts dans la synthèse de nouveaux ligands chiraux, dans leur optimisation ainsi que dans la compréhension des mécanismes qui régissent la sélectivité d'un catalyseur.

Avec l'émergence de ces nouveaux ligands, de nombreuses réactions asymétriques sont développées (hydrosilylation, oxydation, etc...) mais c'est certainement l'hydrogénation asymétrique qui connaît le plus fort développement.

Historiquement l'hydrogénation hautement énantiosélective est obtenue essentiellement pour des substrats possédant des groupes fonctionnels à proximité du groupement insaturé, avec des complexes de Rhodium(I) et Ruthénium(I) combinés à des diphosphines chirales.^[5] Dans les années 1980, la découverte du BINAP^[21] (figure I.1.4 b)) et de ses dérivés permet d'obtenir des complexes très efficaces en catalyse asymétrique, en particulier pour la réduction de cétones. Plus récemment, d'autres ligands diamminés, ou de type phosphine-oxazoline ou encore amino-alcool ont été développés (figures I.1.4 c à f)).^[2, 5, 22-26]

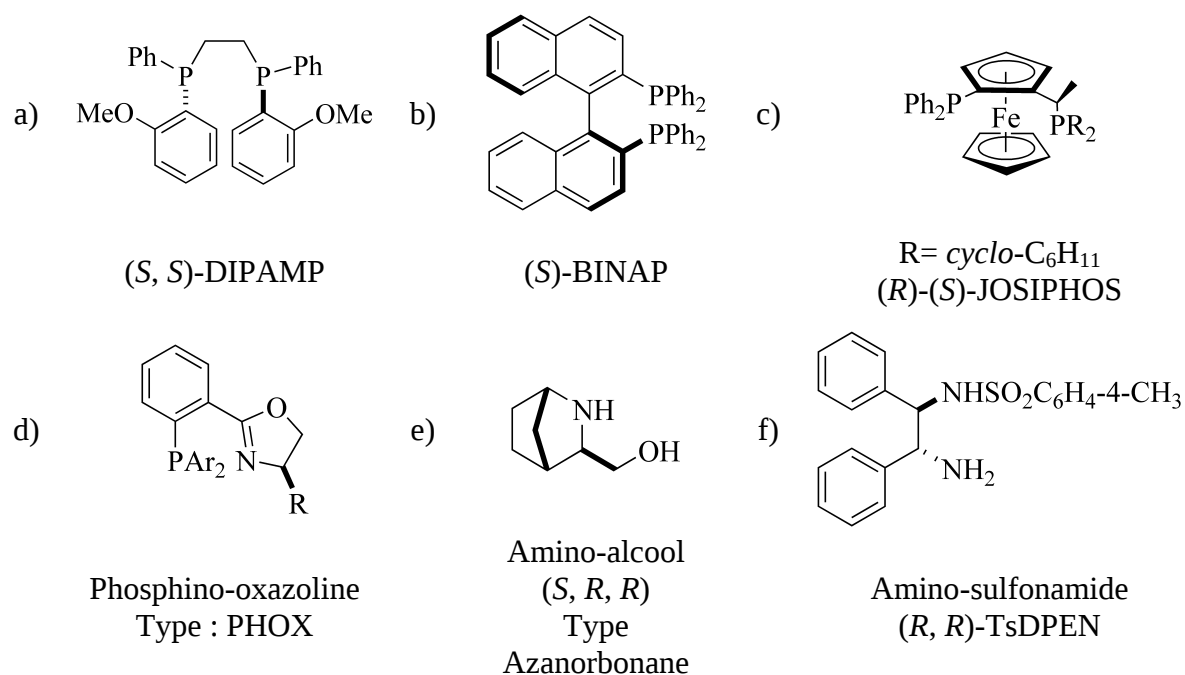


Figure I. 1.4 : Quelques classes de ligands.

Ces ligands chiraux, qui constituent la première sphère de coordination autour du métal présentent différents types de chiralité. Le DIPAMP porte la chiralité sur les atomes de phosphores. Le BINAP et ses dérivés possèdent une chiralité axiale de type atropoisomérique. Les ligands de type JOSIPHOS ont une chiralité planaire et une chiralité centrale sur le squelette carboné qui porte les phosphines.

1.2.1.1. Influence de la première sphère de coordination

De manière à développer les meilleurs ligands, il est essentiel de comprendre les règles qui régissent la sélectivité. L'étude mécanistique d'un catalyseur semble être une bonne approche.^[27] Cependant, il est parfois difficile d'isoler et de caractériser un intermédiaire réactionnel. De plus, il n'est pas évident que l'intermédiaire caractérisé soit l'espèce (catalytiquement) active. Concernant l'approche d'un substrat insaturé qui possède deux faces prochirales (faces *Si* et *Re*), la théorie des cadrans^[28, 29] suggère que l'influence de la première sphère de coordination et permet une approche « rationnelle » pour prédire l'énantiosélectivité. Toutefois, cette règle reste empirique et il est encore impossible de

prévoir avec certitude, pour un nouveau complexe, quel sera l'énantiomère produit et avec quelle efficacité.^[11, 30]

1.2.1.2. Influence de la seconde sphère de coordination

Bien que peu étudiée, il est clairement établi que la présence d'additifs dans le milieu réactionnel, comme des molécules organiques simples, des sels (contre ion), ou l'utilisation d'un solvant plutôt qu'un autre, peut avoir des répercussions importantes sur l'efficacité d'un catalyseur.^[31] Cela suggère que les interactions faibles de seconde sphère de coordination influencent le catalyseur tant au niveau de l'activité que de la sélectivité.

Pfaltz et al.^[32] ont montré l'effet drastique des contre ions dans le cadre de l'hydrogénation asymétrique d'alcènes par les complexes $[\text{Ir}(\text{PHOX})\text{L}_2]\text{X}$ (avec $\text{X} = \text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4^-$, PF_6^- , CF_3SO_3^-). La conversion passe de 0 à 99 % en remplaçant $\text{X} = \text{CF}_3\text{SO}_3^-$ par $\text{X} = \text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4^-$. De plus, l'addition d'eau (0.05% v/v) désactive totalement le complexe $[\text{Ir}(\text{PHOX})\text{L}_2]\text{PF}_6$ (diminution de 94% de conversion) alors que pour le complexe $[\text{Ir}(\text{PHOX})\text{L}_2]\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4$ la conversion reste stable (diminution de 5% uniquement). Cet exemple démontre l'influence de la seconde sphère de coordination sur un catalyseur, en particulier l'effet de solvation des ions.

Au même titre, l'énantiosélectivité peut être significativement influencée, jusqu'à une augmentation de sélectivité de 99.5 % dans le meilleur des cas.^[33, 34]

En définitive, les différences de polarités induites par les solvants et les interactions de type liaison hydrogène ou dipolaire sont autant de facteurs qui composent ces interactions de seconde sphère.^[35] Elles jouent un rôle important et apparaissent difficilement contrôlables ou prévisibles en chimie organométallique « classique ».^[31] De ce fait, la recherche du catalyseur idéal reste encore très empirique et souvent basée sur la méthode : « trial-and-error ».

1.2.2. Approche combinatoire

La recherche des conditions idéales de catalyse pour un substrat donné ne pouvant être anticipée,^[29] la chimie combinatoire s'est rapidement imposée pour développer de nouveaux catalyseurs.^[36]

Généralement, l'amélioration d'un catalyseur est basée sur un cycle qui comprend 3 phases (figure I.1.5 a)). La première est la conception du catalyseur par une combinaison « métal – ligand ». La seconde phase consiste à synthétiser le catalyseur. Au cours de la troisième phase, il est testé en catalyse. L'analyse des résultats obtenus conduit à la conception d'un nouveau catalyseur, supposé plus performant. Cette itération doit être reproduite un grand nombre de fois pour pouvoir générer un catalyseur réellement efficace. Le temps investi pour une telle méthode d'optimisation est clairement le facteur limitant.^[37] Une alternative à ce problème est de concevoir une approche combinatoire associée à du criblage à haut débit permettant d'effectuer le cycle d'optimisation simultanément pour un grand nombre de combinaisons de catalyseurs (figure I.1.5 b)).

Pour être efficace cette méthode requiert de remplir 3 conditions principales : ^[4, 38]

- **Une source de diversité conséquente** : La diversité peut être amenée par une librairie de ligands, de précurseurs métalliques, ainsi que par les variables attenantes aux conditions de réaction (température, solvants, additifs, contre ions, etc.).
- **La synthèse de catalyseurs à haut débit** : Les catalyseurs doivent être synthétisés rapidement et avec un bon degré de pureté.
- **Une méthode de criblage à haut débit** : On doit disposer d'une méthode d'analyse rapide et efficace pour identifier les bons catalyseurs.

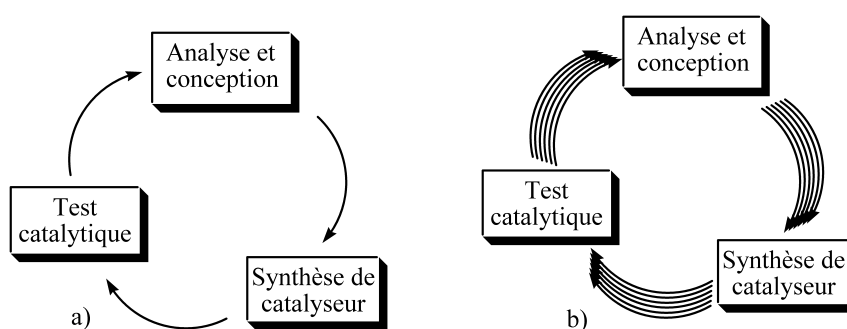


Figure I. 1.5 : Approche combinatoire. a) Procédure classique. b) Procédure à haut débit.

La chimie combinatoire a connu un succès relatif pour l'optimisation de catalyseurs asymétriques.^[36, 37, 39]

Par exemple, Gilbertson et Wang^[40] ont identifié le catalyseur le plus efficace d'une série de complexes obtenus à partir de 64 ligands diphosphines peptidiques. Cette librairie de ligands a été générée en variant certains acides aminés de l'hélice α portant les groupements phosphines. Il est vrai que la synthèse en parallèle sur support permet d'accéder relativement rapidement à une diversité structurelle des ligands. Ce type d'exemple marque un pas dans l'optimisation de la sélectivité par une approche combinatoire. Toutefois, à l'heure actuelle, la source de diversité n'est plus nécessairement le facteur limitant tant il y a de précurseurs métalliques et de ligands disponibles sur le marché (condition 1).^[41] Le problème majeur provient de la quantification de l'énantiosélectivité (condition 3) qui nécessite l'emploi de méthodes (GC, HPLC, fluorimétrie, etc...) difficilement adaptables à du haut débit. Si des techniques biologiques permettent de cribler jusqu'à plusieurs milliers d'échantillons chaque jour par des tests d'activité enzymatique ou d'affinité (drogue – récepteur), la quantification de l'excès énantiomérique est plus délicate à mettre en œuvre. Le criblage de l'énantiosélectivité reste limité au mieux à une ou quelques centaines d'échantillons par jour.^[37] Bien que certaines avancées aient été réalisées avec la thermographie IR ou l'électrophorèse capillaire modifiée, ces techniques sont encore mal adaptées.^[37]

Le criblage à haut débit de l'énantiosélectivité demeure un challenge pour les prochaines années, d'autant que l'émergence de biocatalyseurs assistés par les techniques de mutagenèse permet désormais de générer plusieurs milliers de catalyseurs en peu de temps.^[36, 37] (Ces catalyseurs et les techniques qui y sont rattachées seront abordés dans le chapitre 2).

1.3. Réduction énantiosélective des dérivés carbonylés

Pour obtenir des alcools chiraux, indispensables à la synthèse de produits à haute valeur ajoutée (pharmacologie, agrochimie, parfumerie, nouveaux matériaux), la réduction asymétrique de cétones est une méthode de choix.^[2, 5]

Très étudiée ces quatre dernières décennies, l'hydrogénation énantiosélective est pour une grande part liée à l'évolution qu'a connue la catalyse asymétrique.^[12] L'insertion de dihydrogène sur une cétone présente l'avantage de donner peu de sous-produits.

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 fonctionnalisées ou non.^[2, 5, 20]

1.3.1. L'hydrogénation par le BINAP et ses dérivés

Pour des cétones possédant un groupe fonctionnel ou un hétéroatome proche (β -cétoester, α -hydroxycétone, etc.) capable de se fixer sur le centre métallique, les catalyseurs de type $[\text{RuL}_2\text{-BINAP}]$ sont très actifs et hautement sélectifs.^[42]

Par exemple, le 4-chloro-3-hydroxyester chiral (figure I.1.6), précurseur de la Carnitine et du GABOB, est obtenu quantitativement et très sélectivement en 4 minutes.^[2]

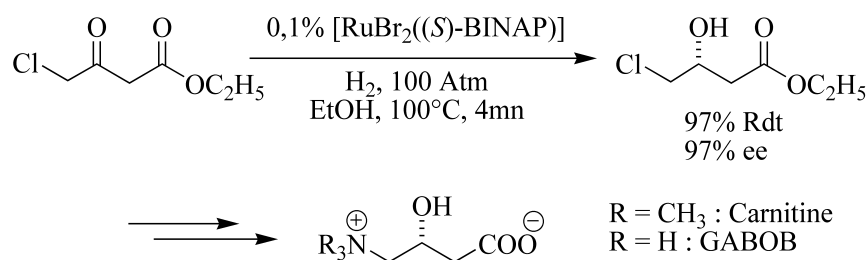


Figure I. 1.6 : La carnitine est responsable du transport des acides gras à longues chaînes à travers les membranes cellulaires. Le GABOB est utilisé comme anti-épileptique et également comme agent anti-hypotension.

Combiné à un deuxième ligand chiral, de type diamine, les complexes ruthénium – BINAP se révèlent très efficaces pour la réduction de cétones ne possédant pas de groupes fonctionnels (figure I.1.7).^[23, 43, 44]

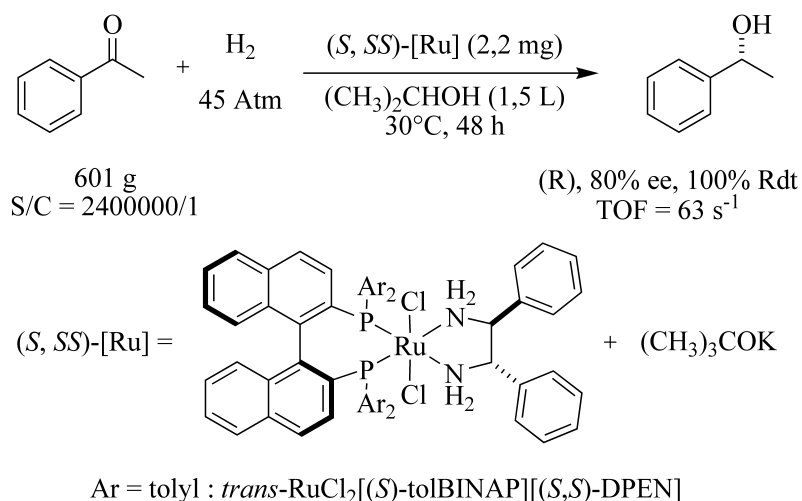


Figure I. 1.7 : Hydrogénation de l'acétophénone (dérivé carbonyle non fonctionnalisé).

Dans cet exemple, l'acétophénone est réduite quantitativement avec un ratio substrat / catalyseur (S / C) de 2 400 000 pour 1 avec un TOF de 63 s⁻¹.

Ce type de catalyseur est utilisé avec un solvant protique polaire (isopropanol) en présence d'une base alcaline comme tBuOK ou KOH.^[45] Noyori a montré que ces complexes peuvent être également utilisés sans base si le complexe chlorure précurseur [RuCl₂(P-P)(N-N)] est transformé, *via* NaBH₄, en complexe hydruure [RuH₂(P-P)(N-N)] (espèce catalytiquement active).^[46] Cette méthode, sans base, permet de réduire les cétones dans des conditions plus douces. Néanmoins, des études mécanistiques ont montré l'importance de la base (tBuOK) et du contre ion (K⁺ > Na⁺ > Li⁺) qui favorisent et accélèrent l'addition oxydante de H₂ sur le Ru(II).^[47, 48]

1.3.2. Le transfert hydrogénant

Le principe du transfert hydrogénant est de substituer le dihydrogène (H₂ gaz) par une molécule organique stable capable de transférer formellement H₂ sur un substrat insaturé en présence du catalyseur.^[49] Cette méthode est efficace pour une échelle de production limitée. C'est une technique de réduction douce, facile à mettre en œuvre et peu onéreuse.^[4]

1.3.2.1. Sources d'hydrures et aspects mécanistiques

Le 2-propanol^[50, 51] et l'acide formique^[52], sous forme d'azéotrope avec la triéthylamine, sont les donneurs d'hydrures les plus couramment utilisés.^[53] Deux types de mécanisme sont à envisager en fonction du métal et de la source d'hydrures utilisés.^[54]

a) Le transfert hydrogénant direct :

C'est un mécanisme concerté, mettant en jeu un état de transition à six centres dans lequel le donneur d'hydrogène (dans ce cas le 2-propanol) et l'accepteur (la cétone) sont à proximité du centre métallique (figure I.1.8). Le mécanisme est similaire à celui proposé pour une réduction de Meerwein-Ponndorf-Verley (MPV).^[47, 49]

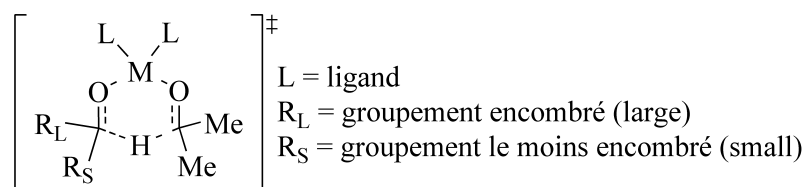


Figure I. 1.8 : Mécanisme de type Meerwein-Ponndorf-Verley

Dans ce type de mécanisme le substrat est directement lié au métal.

b) La voie par l'hydrure (hydridic route) :

Le mécanisme (figure I.1.9)^[49, 55-58] se décompose en plusieurs étapes et suppose la formation d'un complexe hydrure **A**. Il provient de l'insertion sur le métal de l'hydrogène β du donneur (HCOOH ou 2-propanol), via l'état de transition **B**, suivie par l'élimination de diméthylcétone ou de CO₂. L'espèce **A** réduit le dérivé carbonyle prochiral. Avec le 2-propanol comme source d'hydrures l'insertion β-H est réversible, ainsi le 2-propanol et l'acétone formés sont en équilibre.^[59] Afin de mener la réaction de transfert hydrogénant à son terme, le 2-propanol est utilisé comme solvant, en large excès, afin de déplacer l'équilibre. Il est également possible d'utiliser l'acide formique qui donne lieu à une réaction irréversible (libération de CO₂).^[53]

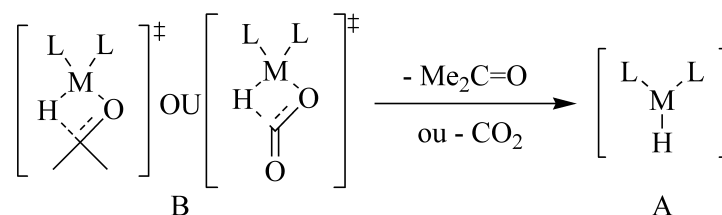


Figure I. 1.9 : Mécanisme impliquant la voie par l'hydrure.

Avec les métaux de transition, principalement le Ru, Rh et Ir, c'est la formation de l'hydrure qui est généralement admise.^[47, 60-63] Le complexe de Ruthénium (II) en tabouret de Piano, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymène})\text{RuCl}(1S, 2S)\text{-}p\text{-TsNCH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{NH}_2]$, utilisant le ligand TsDPEN (figure I.1.4 f)) est certainement l'un des plus efficaces et des mieux étudiés. Tous les intermédiaires ont été isolés et caractérisés par rayons X par Noyori et son équipe.^[59, 64] Ces études ont permis de décrire le mécanisme et de montrer l'importance de l'hydrogène axial de la fonction amine du ligand (« NH effect »). Ce NH, nécessaire à l'activation du carbonyle, est directement impliqué dans le transfert du proton sur l'alcool en formation.^[47, 53, 64] De ce fait, le substrat n'est pas directement coordonné au métal. Le transfert d'hydrure procède *via* l'extérieur de la première sphère de coordination (sphère externe) avec assistance du ligand.^[65, 66] Les intermédiaires ainsi que le cycle catalytique sont détaillés dans la figure I.1.10.^[67]

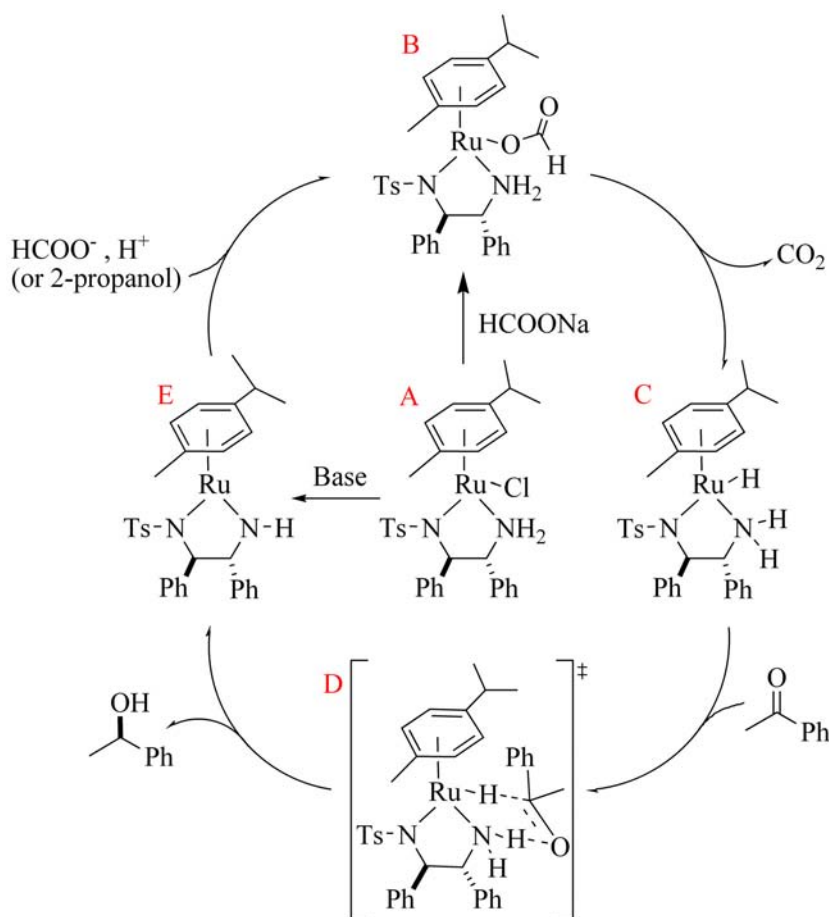


Figure I. 1.10 : Cycle catalytique du transfert hydrogénant énantiosélectif de cétones non fonctionnalisées par $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{RuCl}(\text{1S}, \text{2S})\text{-}p\text{-TsNCH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{NH}_2]$.

Le précurseur catalytique **A** réagit avec le donneur d'hydrure (2-propanol ou l'acide formique) pour donner l'intermédiaire **B** qui évolue rapidement, par l'insertion $\beta\text{-H}$, en complexe hydruure **C** catalytiquement actif (complexe jaune de Ru(II) à 18 électrons). Cette espèce **C** oriente et active le substrat dans un état de transition **D**. Cet état de transition est concerté et comprend 6 centres, dont le ruthénium, le proton axial et l'amine, l'oxygène du carbonyle, l'hydrure métallique et le carbone électrophile du substrat. L'espèce **D** évolue rapidement pour libérer le produit et l'intermédiaire réactionnel **E** (complexe violet de Ru(II) à 16 électrons). L'espèce **E** peut à son tour réagir avec la source d'hydrures pour régénérer le complexe hydruure **C** via l'intermédiaire **B**.

On notera que la présence d'une base est uniquement nécessaire pour passer du précurseur **A** à l'espèce **E** ou directement de **A** à **B**. Ainsi une base alcaline comme KOH

ou encore tBuOK est employée avec le 2-propanol. L'acide formique est utilisé sous forme d'azéotrope avec la triéthylamine ou sous forme de sel basique (par exemple HCOONa).

Avec les cétones aromatiques, la sélectivité de ces catalyseurs s'explique par la présence d'une interaction favorable de type attraction CH/ π (figure I.1.11 a)) au niveau de l'état de transition concerté à six centres.^[65, 68, 69] Le rôle du ligand chiral (TsDPEN ou de ces analogues amino-alcools) est d'imposer la chiralité sur le ruthénium. Dans le cas de ligand (S, S) le ruthénium est (R) et l'énantiodiscrimination des faces prochirales *Si* et *Re* provient de l'interaction entre le proton (CH) de l'arène et les orbitales π du substrat qui stabilise l'état de transition *Si* (ET *Si*) plutôt que l'autre diastéréoisomère (ET *Re*) (figure I.1.11 b)). Cette interaction CH/ π privilégie la présence du groupement aryle face au ligand arène plutôt que le groupement alkyle.^[58]

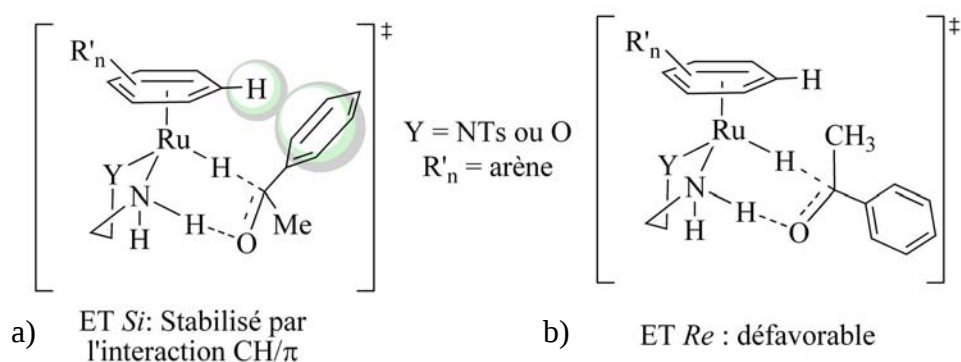


Figure I. 1.11 : Etats de transition et interaction CH/ π avec un complexe Ru_(S). Les groupements phényle du ligand ne sont pas représentés afin de simplifier la figure.

1.3.2.2. Les différents systèmes et leurs ligands

Depuis le milieu des années 1990, de nombreux ligands ont été découverts ou développés pour le transfert hydrogénant. Ces ligands peuvent être classés en différentes catégories dont quelques unes sont représentées ci-dessous (figure I.1.12).

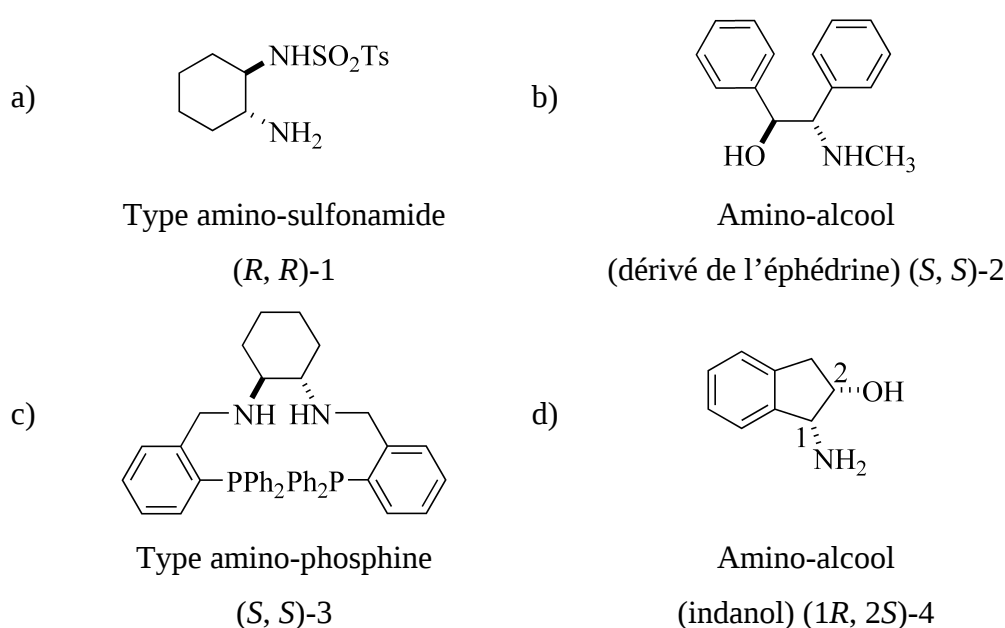


Figure I. 1.12 : Différentes classes de ligands actifs pour le transfert hydrogénant.

On distingue les ligands de type diamine monotosylée comme le TsDPEN (chap. 1.2.1 figure I.1.4 f)), ou le ligand (R, R)-1 (figure I.1.12 a)). Ceux-ci figurent parmi les ligands les plus efficaces que se soit en termes de conversion (TOF) ou de sélectivité.

Les β -amino-alcools^[62, 70] sont également très employés et sont véritablement les plus actifs (TOF les plus élevés), notamment le ligand (S, S)-2 (figure I.1.12 b)) dérivé de l'éphédrine, le (1R, 2S)-4 (figure I.1.12 d)) de structure indanol^[71, 72] ou encore ceux de type azanorbornane (chap. 1.2.1 figure I.1.4 e)).^[73] En général, les complexes basés sur les ligands amino-alcool s'utilisent avec le 2-propanol car ils sont incompatibles avec l'utilisation d'acide formique comme source d'hydrures.^[49]

Watanabe et Ogo ont également décrit l'utilisation de bipyridines (bipy) notamment avec le complexe cationique $[\eta^6-(C_6Me_6)Ru^{II}(bipy)(H_2O)]^{2+}$. Ce complexe est actif mais non sélectif en transfert hydrogénant, à partir de 70°C^[61, 74], comparativement aux 35°C requis pour les complexes de ruthénium en tabouret de piano. Le mécanisme pour les complexes de bipyridines est sensiblement différent. Comme les bipyridines ne possèdent pas d'amine primaire ou secondaire, le proton nécessaire à l'activation du dérivé carbonyle provient du milieu de catalyse. Il n'y a donc pas « d'effet NH » et le mécanisme est de type sphère externe sans assistance du ligand.^[47]

Des ligands tétradentates de type diphosphines / diamines ont également été développés (figure I.1.12 c). Ils se révèlent plus efficace que leurs homologues diimines / diphosphines qui ne possèdent pas de NH libre.^[75, 76]

Beaucoup d'autres ligands ont été décrits et employés en transfert hydrogénant ces dix dernières années. Ces ligands comportent différents groupements^[77, 78], comme le motif oxazoline dans les dérivés de type (phosphinoferrocenyl)oxazoline^[79], ou encore utilisent des acides aminés^[80-83], notamment des dérivés de proline^[84, 85]. Très récemment, M. Reetz et al.^[86] ont décrit des ligands phosphonites. Ces complexes de Ru(II)bis-phosphonite sont hautement sélectifs y compris avec des dialkyles cétones qui sont difficiles à réduire avec un bon rendement optique (99 % ee pour l'isopropyl-méthyl-cétone).

En plus de développer de nouveaux ligands, des variantes sont apportées aux différents systèmes catalytiques. Par exemple, de manière à recycler le catalyseur, le ligand TsDPEN a été greffé sur support solide^[87-89] ou à un groupement imidazolium de manière à le rendre soluble dans les liquides ioniques^[90]. Les catalyseurs ont également été adaptés au milieu aqueux^[85] en introduisant des fonctions hydrophiles (SO₃H) sur des ligands existants (TsDPEN).^[91, 92] Par la suite, J. Xiao et al. ont montré que les complexes [RuCl₂(η⁶-arène)(Ts-DPEN)] pouvaient être directement utilisés dans l'eau. Dans ces conditions, on constate une accélération de la catalyse^[67, 85] et J. Xiao montre l'influence du pH tant au niveau de la conversion que de la sélectivité.^[88]

Un exemple d'application du transfert hydrogénant est donné figure I.1.13.

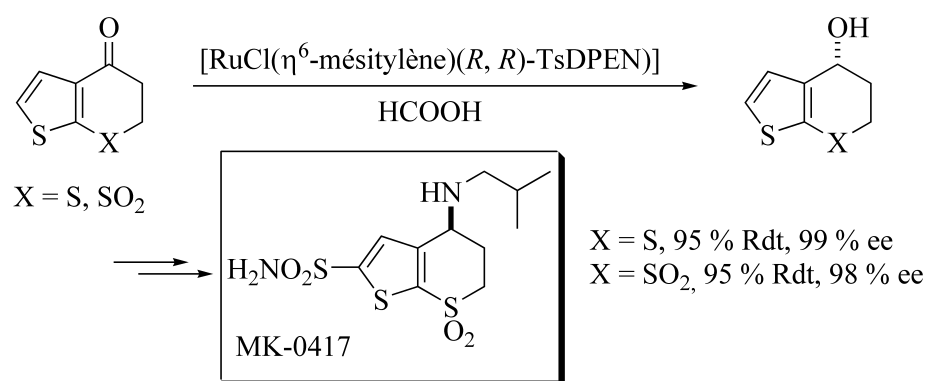


Figure I. 1.13 : Transfert hydrogénant d'un intermédiaire important de la synthèse du MK-0417, un inhibiteur de l'anhydrase carbonique.^[64]

1.3.3. Comparaison entre hydrogénation et transfert hydrogénant

L'hydrogénation permet la synthèse de nombreux composés avec des catalyseurs pouvant atteindre un TON et un TOF extrêmement élevés. C'est une réaction propre qui génère peu de sous-produits, elle est donc bien adaptée aux contraintes industrielles. De plus, elle est très sélective quant aux autres fonctions insaturées présentes sur la molécule.

Le transfert hydrogénant propose d'autres avantages (tableau I.1.1). L'échelle d'application est moins importante (TON et TOF plus faible) et par conséquent correspond mieux à une production pour de faibles quantités, à l'échelle d'un laboratoire. Cette technique est plus simple à mettre en œuvre car elle ne nécessite pas de matériel spécifique (pression) relatif à l'emploi de dihydrogène (gaz explosif). De ce point de vue, le transfert hydrogénant est donc moins cher, moins dangereux et plus écologique (solvant aqueux dans certains cas).^[72] Cette réaction est également très propre et a une grande tolérance pour de nombreuses fonctions chimiques.^[4] Très sélective, elle s'effectue dans des conditions de réaction très douces.^[91] À noter que le transfert hydrogénant qui emploie l'isopropanol comme source d'hydrures est une réaction réversible. L'acétone formée, pour régénérer le complexe hydrure à partir du 2-propanol, peut servir de substrat pour la réduction. Cette limitation peut être contournée en employant le formiate de sodium ou le mélange acide formique – triéthylamine qui donnent lieu à une réaction irréversible (libération de CO₂).

	Hydrogénation	Transfert hydrogénant
Echelle de production et efficacité	++	-
Champ d'application	++	-
Tolérance des autres fonctions	++	++
Facilité d'emploi (dangerosité)	--	++
Ecologie (chimie verte /recyclage)	+	+
Prix	-	+

Tableau I. 1.1 : Comparaison entre hydrogénation et transfert hydrogénant de cétones.

L'hydrogénation et le transfert hydrogénant sont des systèmes complémentaires.^[4, 49]

1.4. Résolution cinétique

1.4.1. Principes et exemples

La résolution cinétique est considérée comme une méthode de choix pour obtenir des alcools chiraux.^[4, 23] Le principe de la résolution cinétique est de transformer sélectivement un des deux énantiomères d'un mélange racémique d'alcool afin d'obtenir un mélange enrichi par l'énantiomère non consommé. Le rendement qui ne peut excéder 50 % est la limitation intrinsèque de cette technique. Pour contourner ce problème, la recherche s'oriente vers la résolution cinétique dynamique.^[4, 5]

Un exemple de résolution cinétique dynamique employée en combinaison avec l'hydrogénation est présenté figure I.1.14. Ce système permet une résolution dynamique du centre stéréogénique en α de la cétone qui est hydrogénée sélectivement. Cette réaction permet de contrôler les deux centres asymétriques avec un haut degré de sélectivité. La présence de base dans le milieu rend la configuration du centre chiral en α labile et favorise la résolution cinétique.^[23]

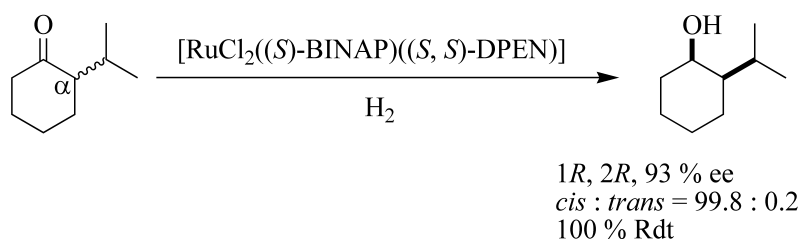


Figure I. 1.14 : Résolution cinétique dynamique du mélange racémique de 2-isopropyle-cyclohexanone.

1.4.2. Résolution cinétique par transfert hydrogénant : réaction micro-réversible

Le principe de micro-réversibilité s'applique très bien au transfert hydrogénant qui peut être considéré à la fois comme une réaction de réduction et d'oxydation.^[93] Le transfert d'hydrogène avec le 2-propanol étant par essence réversible, Noyori et al.^[94] ont utilisé des complexes de type $[\eta^6\text{-(arène)Ru(II)(Ts-DPEN)Cl}]$ pour réaliser l'insertion $\beta\text{-H}$ énantioselective à partir d'un mélange racémique d'alcool comme l'acétophénone ou la cyclo-hexen-2-one. Lors de cette réaction la diméthylcétone est utilisée comme substrat sacrificiel (figure I.1.15).

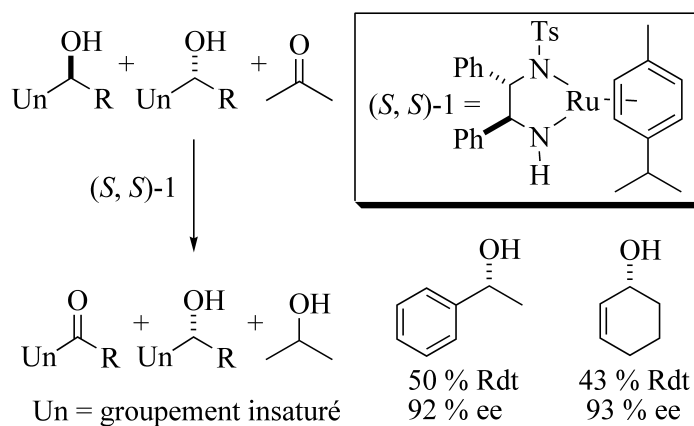


Figure I. 1.15 : Exemple de résolution cinétique par transfert hydrogénant.

Dans cet exemple, le (*S*)-*sec*-phénéthyl-alcool (ou (*S*)-1-phényléthanol) est obtenu avec un rendement quantitatif (50 %) et une pureté optique de 92 % (ee). L'alcool allylique (*S*)-2-*cyclo*-hexenol est obtenu avec 43 % de rendement et 93 % ee.

La résolution cinétique énantiosélective a l'avantage d'être efficace pour les alcools présentant un haut potentiel réducteur : l'oxydation de l'alcool est plus aisée que la réduction de la cétone correspondante. Cette technique est employée pour la synthèse de produits pharmaceutiques d'intérêt.^[93]

De manière à rendre la résolution cinétique dynamique (afin de ne pas perdre 50 % du produit), Bäckvall^[95] utilise un complexe organométallique et une enzyme en tandem (figure I.1.16). L'acylase estérifie sélectivement un des alcools secondaires du mélange racémique tandis que le complexe métallique racémise l'énantiomère non désiré.^[93, 96, 97] Ces procédés qui utilisent conjointement un complexe organométallique et une enzyme, souvent très efficaces pour la résolution cinétique, constituent des systèmes hybrides qui se situent à l'interface entre la chimie organométallique et la biologie.

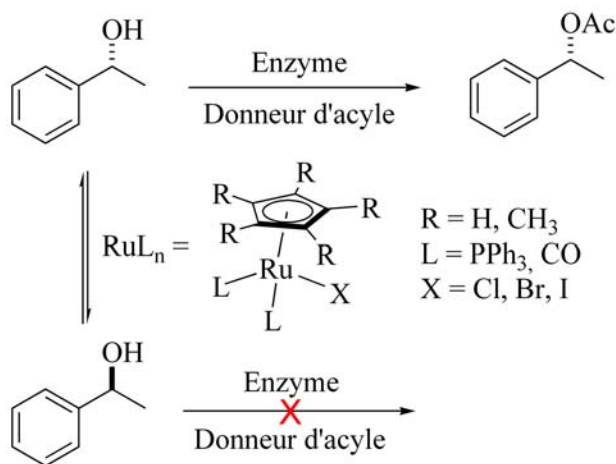


Figure I. 1.16 : Résolution cinétique dynamique par l'utilisation conjointe d'estérase et d'un complexe organométallique capable de racémiser les alcools secondaires.

2. Les Protéines

2.1. Considérations générales

Une protéine est un assemblage d'acides aminés qui constituent la séquence primaire. Cette séquence peptidique s'organise en structure dite secondaire (ex : feuillet β , hélice α) qui forme une architecture tertiaire (ex : β -barel = tonneau β). Dans certains cas, ces dernières forment des structures quaternaires. Par exemple, des protéines dimériques ou tétramériques résultent de l'assemblage de 2 ou 4 monomères.^[98]

2.1.1. Les différents types de protéines : relation structure – activité

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 peut souvent être reliée à sa structure, souvent complexe et spécifique.

Quelques exemples de la relation structure – activité : ^[98, 99]

- 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 de manière à laisser passer des molécules polaires.
- Les anticorps sont des protéines hautement spécifiques, capables de fixer avec une très grande affinité un antigène (ou haptène) ($K_a = 10^{6-11} \text{ M}^{-1}$). Le site de reconnaissance et d'accrochage d'un anticorps est appelé paratope et il interagit spécifiquement avec le site antigénique qui lui est complémentaire, appelé épitope. Tel un Lego[®] parfaitement emboîté, l'arrangement structural ainsi que la nature des acides aminés du paratope définissent la fonction propre de l'anticorps.

- 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 le ou les substrats qu'elles transforment. Compte tenu du rôle primordial qu'elles jouent dans le métabolisme, leur structure est très étudiée.

2.1.2. 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 est capable d'être hautement régiosélective et énantiosélective. Elle a la capacité de distinguer deux mêmes fonctions chimiques qui seraient indifférenciées 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.^[100] Toutefois cette grande sélectivité s'accompagne d'une faible tolérance en terme de variation de substrats. Afin de mieux comprendre les avantages de la catalyse enzymatique, elle est comparée à la catalyse homogène (tableau I.2.1).^[101, 102]

	Catalyse homogène	Catalyse enzymatique
Variation de substrats	Elevée	Faible
Accès aux énantiomères	2 énantiomères	1 seul énantiomère
Tolérance aux solvants et additifs	Grande	Faible
Tolérance des fonctions et régiosélectivité	Faible	Elevée
Efficacité (TON et TOF)	Modeste	Elevée
Conditions d'optimisation	Chimique	Génétique
Répertoire de réactions	Elevé	Faible
Seconde sphère de coordination	Mal définie	Bien définie
Mise en œuvre	Complexe	Simple

Tableau I. 2.1 : Comparatif entre la catalyse homogène et la catalyse enzymatique.

Prenant en compte ces considérations, la catalyse homogène et la catalyse enzymatique apparaissent complémentaires par bien des aspects.^[103, 104]

2.2. 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.^[101, 105] Actuellement, on compte plus de 130 procédés industriels faisant intervenir ces biocatalyseurs et la recherche académique, qui est en plein essor dans ce domaine, stimule encore ce développement.^[106]

Ces biocatalyseurs peuvent être divisés en trois catégories : les systèmes existants non modifiés, les systèmes adaptés aux contraintes et les systèmes artificiels ou générés. La première catégorie fait intervenir des systèmes biologiques dont les propriétés ne sont pas modifiées. La deuxième catégorie comprend les biocatalyseurs qui sont adaptés par mutagenèse afin de les rendre utilisables ou plus performants en synthèse. La dernière

catégorie regroupe les systèmes « artificiels » dont les propriétés sont créées pour répondre aux besoins de la synthèse (réactions, substrats, conditions).

2.2.1. Utilisation de systèmes biologiques non modifiés (catégorie 1)

La pénicilline acylase (« penicillin amidohydrolase ») est utilisée industriellement pour l'élaboration d'antibiotiques courants comme entre autre, 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 en réintroduit d'autres produisant ainsi plusieurs dérivés. Ce procédé rapporte à l'industrie pharmaceutique plus d'un milliard de dollars par an (figure I.2.1).^[105]

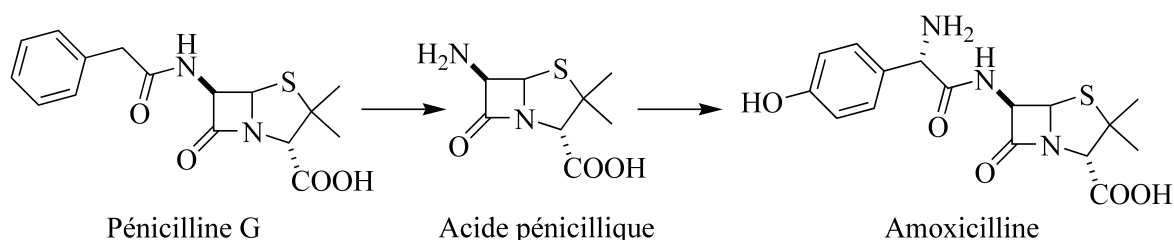


Figure I. 2.1 : Réaction catalysée par la pénicilline acylase.

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 cyanate (groupement CN) en acide.^[107] Les lipases sont surtout employées en résolution cinétique pour l'hydrolyse ou la formation d'esters.^[97, 108, 109] Les déshydrogénases sont utilisées pour l'oxydoréduction des alcools et des cétones.^[101] 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.2.2).^[110, 111]

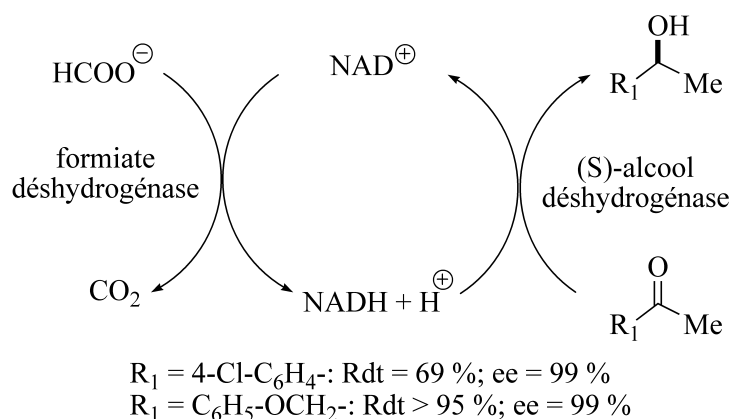


Figure I. 2.2 : Réduction énantiosélective de cétones par des biocatalyseurs.

D'autres systèmes biologiques sont capables de se passer de cofacteur d'oxydoréduction. K. Faber et al.^[112] emploient des cellules lyophilisées de *Rhodococcus ruber* qui consomment un substrat sacrificiel (2-propanol ou acétone) pour réduire ou oxyder le substrat.

Pour d'autres applications, il est également possible d'employer un micro-organisme directement dans son milieu de culture.^[113] La production industrielle de la vanilline est un exemple de l'utilisation des micro-organismes. La bactérie *Escherischia Coli* est employée pour produire l'acide vanillique à partir de glucose. Cette étape combinée à l'action de l'enzyme « aryl aldehyde déshydrogénase » fournit environ 97 % de la production mondiale de vanilline, soit 1200 tonnes par an.^[114]

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 de l'enzyme pour d'autres substrats que ceux qui lui sont propres est une limitation évidente. De plus, il est parfois souhaitable d'obtenir l'énantiomère (R) alors l'enzyme est naturellement (S)-sélective. D'un point de vue pratique, il est parfois nécessaire d'adapter ces procédés à des températures plus élevées ou aux solvants organiques.^[106]

2.2.2. Adaptation des systèmes existants par mutagenèse (catégorie 2)

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

La PCR et l'évolution dirigée permettent de générer rapidement une immense librairie d'enzymes mutées.^[105] Ces mutants possèdent un certain nombre de propriétés qui peuvent différer de la protéine de type sauvage (Wt) (« Wild type »). Ces milliers de mutants sont autant de candidats potentiellement plus efficaces que la protéine de type sauvage pour la réaction visée.^[105] 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.^[115]

Avant de détailler quelques applications, il est utile de définir brièvement la PCR et les différentes techniques de mutation associées.^[105, 116-118]

La PCR (« Polymérase Chain Reaction ») : Mise au point en 1985 par K. Mullis (prix Nobel en 1993), cette technique permet d'amplifier une séquence d'ADN, grâce à une classe d'enzymes appelées Taq-polymérase, à partir d'amorces d'ADN simples brins complémentaires au gène cible. Dans un premier temps, l'ADN est dénaturé (séparation des doubles brins en simple brin) dans un milieu réactionnel adéquat à l'aide d'une température bien définie (~92-95°C). Une seconde étape, à une température plus basse (~45-55°C) permet l'hybridation des amorces sur les brins d'ADN complémentaires. Dans une dernière étape, le milieu réactionnel est amené à une température dite de polymérisation (65-72°C). L'enzyme entre en action et réplique l'ADN à partir de l'amorce. Cette séquence constitue un cycle PCR qui est répété un grand nombre de fois pour une amplification optimale du gène.

La PCR aléatoire (« error prone : epPCR ») : C'est une technique de mutation aléatoire basée sur la PCR. La modification du cycle de température ou l'introduction d'additifs qui perturbent l'enzyme polymérase sont capables de provoquer des erreurs de polymérisation. Il est également possible d'utiliser une polymérase défailante. Toutes ces techniques se traduisent par l'introduction aléatoire de mutations génétiques. Lors de la

traduction du génome cela entraîne la production d'enzymes portant un à plusieurs acides aminés mutés.

Mutagenèse par saturation (« saturation mutagenesis »): Cette technique consiste à remplacer un ou plusieurs acides aminés prédéterminés par l'un des 19 autres. La mutation est introduite à l'aide d'une amorce d'ADN partiellement complémentaire comprenant un ou plusieurs codons dégénérés dans la séquence. Un codon est une succession de trois bases d'ADN qui code pour un acide aminé.

Il existe d'autres techniques de mutagenèse très utilisées comme, par exemple, le brassage génétique (« DNA shuffling ») qui permet d'obtenir une très grande diversité en recombinant divers fragments d'ADN de plusieurs gènes homologues.^[119]

Ces techniques de mutagenèses permettent d'augmenter la stabilité des enzymes (température, solvant), d'élargir la tolérance pour différents substrats, d'augmenter l'activité et la sélectivité, allant jusqu'à favoriser la production de l'énantiomère opposé.^[105, 116, 120-123]

Un exemple d'adaptation d'une lipase, utilisée pour la résolution cinétique d'esters, est présenté ci-dessous (figure I.2.3). Par une combinaison epPCR et mutagenèse par saturation, Reetz et al.^[122] ont obtenu un mutant qui augmente le facteur d'énantiosélectivité (*E*) de plus de 24 unités (*E* = 25.8) par rapport à la lipase Wt (*E* = 1.1 soit non sélectif).

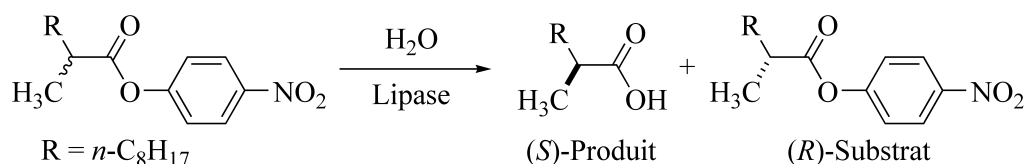


Figure I. 2.3 : Résolution cinétique du 2-méthyldecanoate de *p*-nitrophényle ester.

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.^[123] Cependant ce procédé ne permet pas de modifier le type de transformation catalysée par l'enzyme.^[119] 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.^[101] De ce fait, les biocatalyseurs ne répondent pas totalement aux besoins des chimistes pour la synthèse asymétrique.^[101, 105, 119]

2.2.3. Génération de systèmes compatibles (catégorie 3)

Afin de créer un système, ayant les propriétés requises, compatible avec la réaction et les substrats voulus, plusieurs approches sont possibles.^[104, 124]

2.2.3.1. Les anticorps catalytiques

Les anticorps sont produits à partir des cellules du système immunitaire d'un organisme supérieur. Cette réponse immunitaire est induite par la présence d'un corps étranger (antigène). Les anticorps ou immunoglobulines ont une taille comprise entre 6 et 34 Å et la constante d'affinité pour leur haptène (antigène) varie de 10^5 à 10^{12} M^{-1} (valeur moyenne : $K_a \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$). Cette affinité est fortement reliée à la nature et la taille de l'antigène.^[125, 126] Un anticorps est composé de deux parties symétriques. Chaque partie possède une chaîne lourde (Heavy) et une chaîne légère (Light). Ces deux chaînes comportent des parties constantes (C_H et C_L : Constant Heavy / Light) et des parties variables (paratope) en grande partie responsables de la fixation des antigènes (épitope) (V_H et V_L : Variable Heavy / Light) (figure I.2.4).^[4, 117, 125, 127]

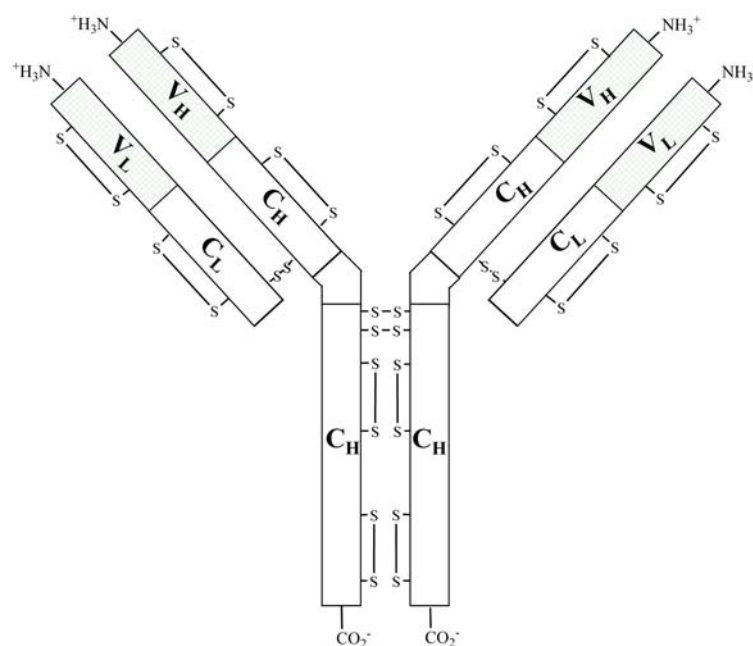


Figure I. 2.4 : Représentation schématique d'une immunoglobuline G (IgG). Les chaînes lourdes et légères sont reliées par des ponts disulfures. Le paratope est légèrement grisé.

Le principe de Pauling définit le pouvoir catalytique d'une enzyme par sa capacité à abaisser l'énergie d'activation d'une transformation chimique en stabilisant l'état de transition de la réaction qu'elle catalyse.^[128] En se basant sur ce principe, R.A. Lerner et P.G. Schultz^[129, 130] développent les premiers anticorps catalytiques à partir d'antigènes mimant un état de transition. Lorsqu'une molécule analogue de l'état de transition d'une transformation est injectée à un animal, cet antigène induit la production d'anticorps monoclonaux spécifiques ayant une grande affinité pour l'état de transition de la réaction. La portée de ce concept est immense, car dans les faits, le système immunitaire peut fournir un anticorps complémentaire à virtuellement tous les corps étrangers qui lui sont présentés. Ainsi en théorie, ce procédé permet de créer un biocatalyseur régiosélectif et énantiosélectif adapté à chaque transformation et pour tout type de substrats.

La reconnaissance structurale et l'ancrage du substrat ou de l'haptène (TSA : Transition State Antibody) sur l'anticorps résulte en général d'interactions faibles (non covalentes) comme des liaisons hydrogènes, hydrophobes ou coulombiennes. Par exemple, les haptènes du type phosphonate, mimant un carbone sp^3 (état de transition pour

l'hydrolyse d'ester ou d'amide) donnent lieu à des sites oxyanions (« oxyanion hole ») stabilisés le plus souvent par des acides aminés basiques (figure I.2.5).^[131, 132]

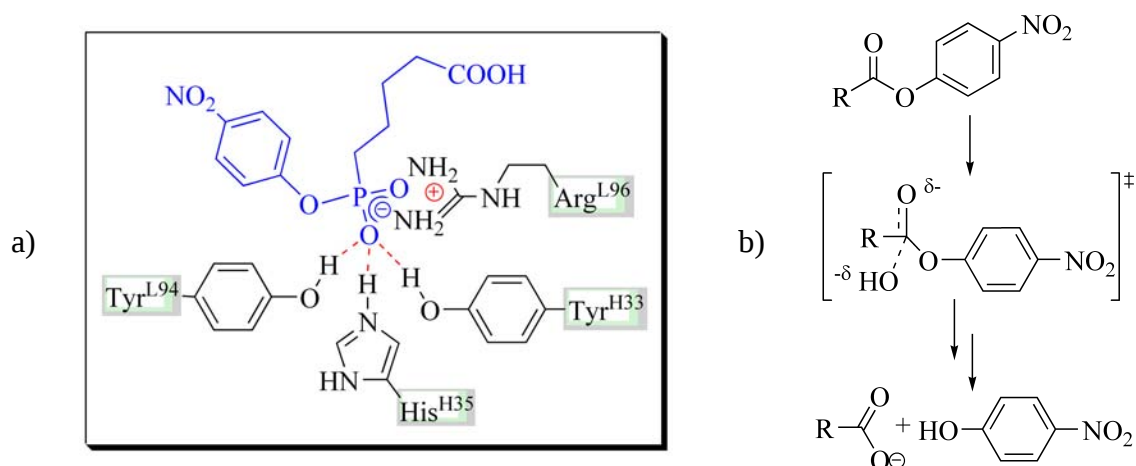
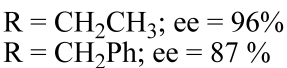


Figure I. 2.5 : Description de l'anticorps catalytique 48G7. a) Architecture du site actif et stabilisation du centre oxyanion de l'haptène phosphonate (en bleu) ; b) Hydrolyse d'esters activés catalysée par cet anticorps.

L'ancrage covalent peut être également rencontré. La formation d'une base de Schiff entre une cétone (haptène) et une lysine, présente au cœur du site d'ancrage de l'immunoglobuline, est décrite dans la littérature.^[129, 133]

Si dans un premier temps les premiers systèmes sont décrits pour l'hydrolyse d'ester ou d'amides^[127], par la suite de nombreuses réactions sont développées comme des cyclisations (Claisen, Diels-Alder)^[134], des β -éliminations^[129] ou des réactions d'hydrogénation.^[135] Un exemple de réduction asymétrique de dérivés carbonyles réalisée par un anticorps catalytique et un cofacteur chimique est présenté ci-dessous (figure I.2.6).^[136]



Cette technologie très attractive présente néanmoins certaines limitations. Le pouvoir immunogène d'un antigène étant variable, il est parfois nécessaire de développer différentes synthèses pour accéder à l'haptène efficace. Par ailleurs, la sélection d'un anticorps monoclonal, c'est-à-dire issu d'une unique cellule immunitaire de l'animal infecté et non du sérum, implique l'identification d'un anticorps suffisamment sélectif et affin parmi de nombreux candidats.

La création de métalloenzymes artificielles est une deuxième 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. Ce système hybride permet de combiner les avantages de la catalyse homogène (CH) et de la catalyse enzymatique (CE).^[100, 103, 104, 124] A savoir : une gamme de réaction large (CH), une seconde sphère de coordination bien définie (CE), un large éventail de substrats (CH) et la possibilité d'une optimisation chimique (CH) et génétique (CE). Dans ce but deux stratégies ont été utilisées.

C'est E. T. Kaiser^[137] qui, le premier, modifie 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 (lysine ou cystéine le plus souvent), doit être suffisamment accessible pour réagir. L'enzyme artificielle synthétisée peut avoir une activité catalytique totalement différente de l'enzyme native. En accrochant un dérivé de flavine (cofacteur d'oxydoréduction) à la papaine (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.^[138]

Dans le même esprit, Distefano^[139] accroche un complexe de cuivre(II)-1,10-phénanthroline à la protéine ALBP (Adipocyte lipid binding protein) qui possède une unique cystéine dans le site actif. La nouvelle enzyme obtenue, ALBP-Phen-Cu(II) (figure I.2.7), est capable d'hydrolyser énantiosélectivement les esters activés.

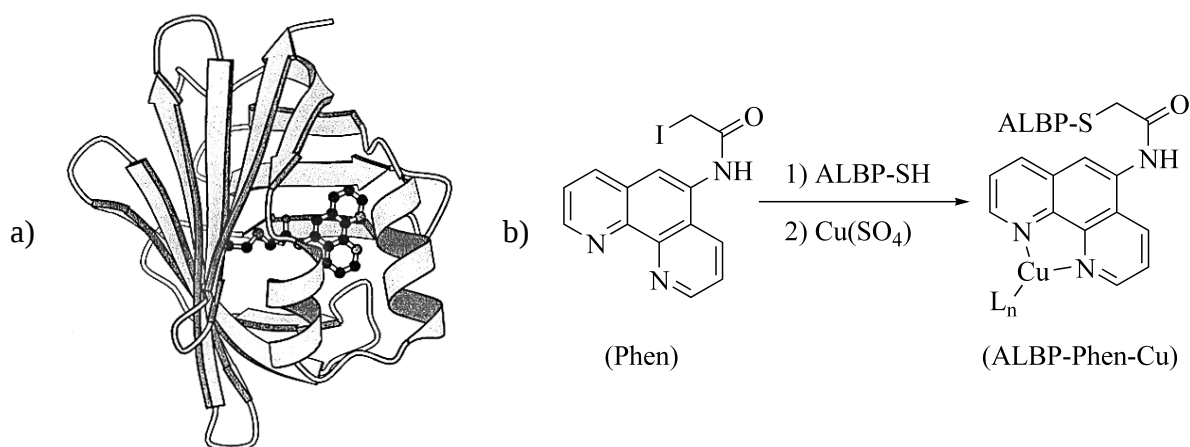


Figure I. 2.7 : Lipase artificielle. a) Représentation schématique de la protéine ALBP-Phen (image tirée de la publication ^[139]). b) Ancrage covalent du iodoacétamido-1,10-phénanthroline (Phen) sur la ALBP.

Plusieurs groupes de recherche utilisent l'ancrage covalent avec d'autres enzymes, comme la subtilisine, l'apomyoglobine ou des lipases. Ces métalloenzymes artificielles sont développées afin de créer des biocatalyseurs asymétriques.^[140-143] La papaine et un

complexe rhodium-phosphite sont combinés afin d'hydrogéner sélectivement l'ester 2-acétamidoacrylate de méthyle (figure I.2.8).^[144]

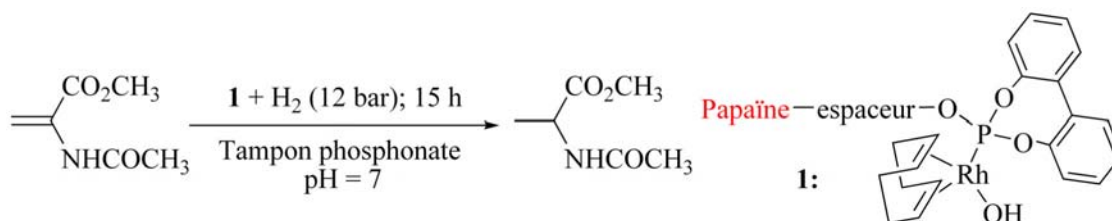


Figure I. 2.8 : Biocatalyseur artificiel pour l'hydrogénation énantiosélective d'oléfines.

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

Si l'ancrage covalent semble permettre d'incorporer 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'ancrages », rendant difficile le contrôle de la réactivité du motif à insérer.^[145] De plus, il est indispensable de contrôler le taux d'accrochage et le cas échéant de pouvoir purifier l'enzyme artificielle désirée.^[141, 144]

b) Ancrage non covalent : stratégie et exemples

A la différence de l'ancrage covalent, il n'est pas nécessaire de modifier chimiquement la protéine hôte. L'ancrage supramoléculaire entre la protéine et le complexe organométallique est basé sur des interactions non covalentes de type électrostatique, hydrophobe ou liaison hydrogène.

Y. Watanabe et al.^[146-148] utilisent l'hème ou 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).^[149]

Z. Gross et al.^[150] utilisent la BSA ou HSA (Bovin ou Human Serum Albumin) comme protéine hôte pour fixer des complexes de corolles amphiphiles afin de former des catalyseurs énantiosélectifs en sulfoxydation (figure I.2.9).

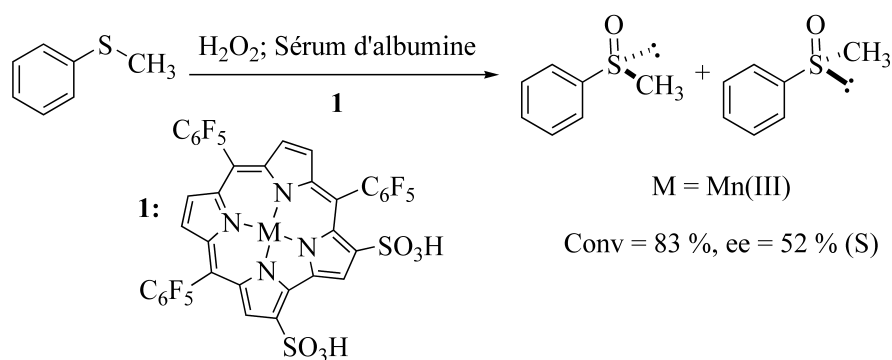


Figure I. 2.9 : Sulfoxydation asymétrique par des catalyseurs hybrides utilisant l'albumine.

Whitesides et Wilson^[151] proposent, en 1978, l'ancrage non covalent d'un complexe de rhodium en utilisant le système biotine – avidine. En accrochant ce complexe 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, ils hydrogènent l'acide α -acétamidoacrylique avec 41 % ee. En 1999, Chan et al.^[152] développent un nouveau complexe de rhodium biotinylé, le $[\text{Rh}(\text{COD})((S,S)\text{-Pyrphos-Biotin})]\text{BF}_4$ 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. Une optimisation chimique et génétique du système biotine – (strept)avidine a permis d'obtenir d'excellents résultats avec une sélectivité atteignant 96 % d'excès énantiomérique (figure I.2.10).^[104, 153-157]

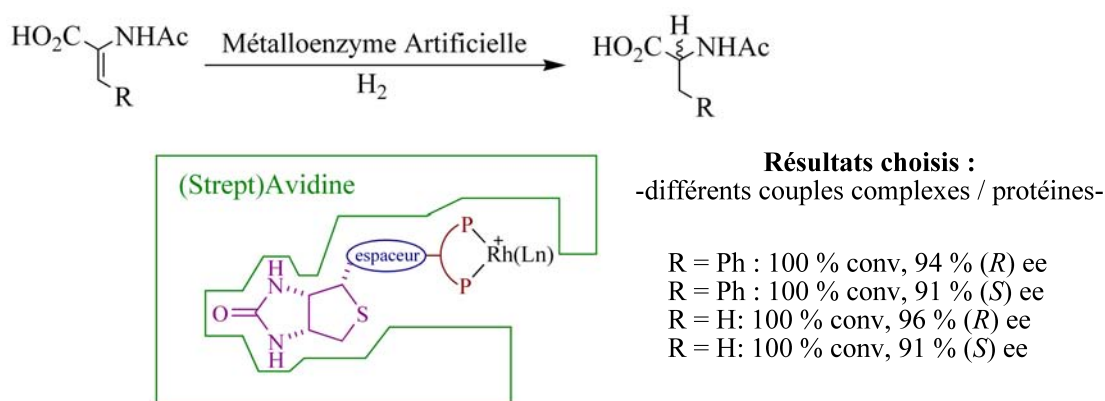


Figure I. 2.10 : Représentation schématique du catalyseur hybride obtenu par un ancrage supramoléculaire basé sur le système biotine-(strept)avidine.

En considérant l'ensemble des différents systèmes, la technologie biotine – (strept)avidine nous apparaît comme la plus 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 à haut débit. De plus, ce système se révèle performant et très sélectif pour l'hydrogénation d'oléfines.

2.3. 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,^[158] alors que la streptavidine est produite par la bactérie *Streptomyces avidinii*.^[159] Leur masse est d'environ 65 000 Da pour l'avidine (128 acides aminés par sous unité) et environ 62 500 Da pour la streptavidine (130 acides aminés par sous unité).^[158, 160] Leur point commun essentiel est leur très grande affinité pour leur substrat, la biotine (vitamine H) (figure I.2.11).^[161] Il s'agit de l'interaction non covalente naturelle la plus forte connue à ce jour.^[158, 162] Cette caractéristique confère à ces deux protéines une activité supposée d'antibiotique comme inhibiteur des enzymes biotine – dépendantes.^[160] Bien que très

similaire, l'affinité de la streptavidine ($K_a \sim 2.5 \cdot 10^{13} \text{ M}^{-1}$) est inférieure à celle de l'avidine ($K_a \sim 1.5 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}$).^[126, 163] Cette valeur reste tout de même 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 $\sim 10^{4-6} \text{ M}^{-1}$ et pour un complexe organique classique, invité – hôte la moyenne est de $\sim 10^{2-4} \text{ M}^{-1}$.^[125, 126]

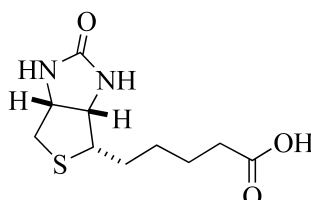


Figure I. 2.11 : Structure développée de la (+)-biotine ou vitamine H.

Ces deux protéines sont très robustes. L'avidine résiste à la dénaturation thermique jusqu'à 85°C et 132°C en présence de biotine. Elles résistent également à la dénaturation dans une gamme de pH allant de 2 à 13.^[158, 164]

En plus de caractéristiques physico-chimiques et biologiques similaires, elles présentent une structure tertiaire et quaternaire tout à fait comparable.^[162, 165]

2.3.1. Structure tridimensionnelle

Ces deux protéines sont homotétramériques, organisées en dimère de dimères. Chaque monomère, ou sous unité, est constitué de 8 feuillets β antiparallèles organisés en tonneau β . Ce tonneau β présente une torsion hélicoïdale chirale et forme une cavité hydrophobe capable de fixer la biotine de manière quasiment irréversible.^[162, 165, 166] La structure schématique de la streptavidine est présentée ci-dessous (figure I.2.12).

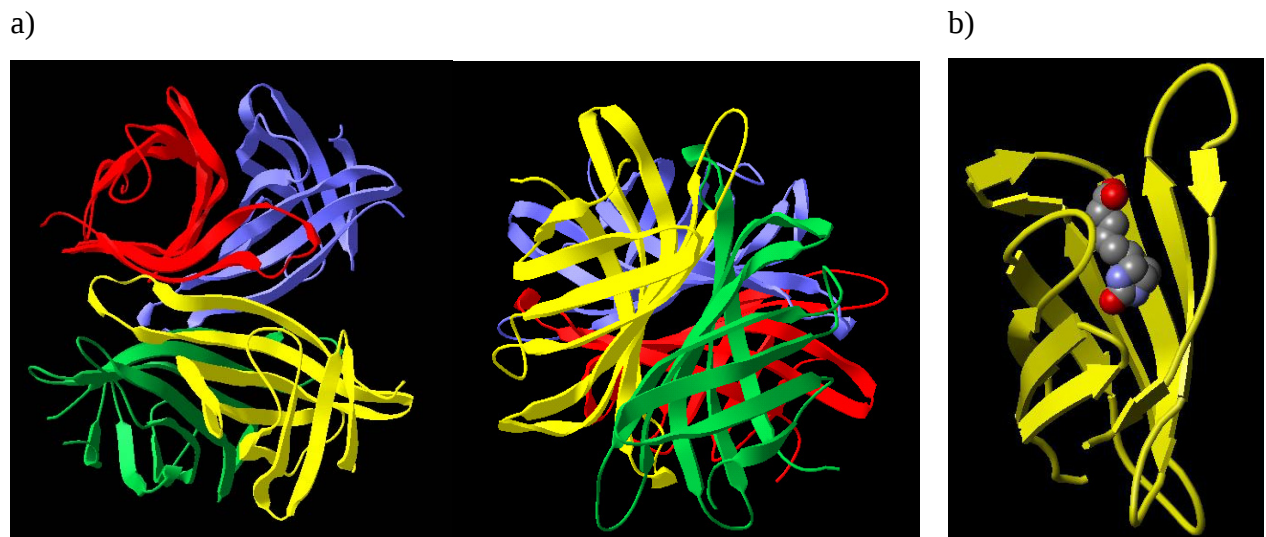


Figure I. 2.12 : Streptavidine : a) Tétramère de streptavidine (deux prises de vue), b) Détail d'un des monomères contenant la biotine.

La cohésion de cette structure est assurée par des interactions diverses, de type polaires (liaisons hydrogènes), hydrophobes ou Van der Waals.^[159, 162] Bien que l'avidine et la streptavidine présentent cette même architecture, leur séquence primaire compte quelques différences notables.

2.3.2. Avidine et streptavidine : homologues 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%).^[126, 159, 162] Ces zones correspondent aux feuillets β qui forment le tonneau β (figure I.2.13 basée sur ^[126, 162]).

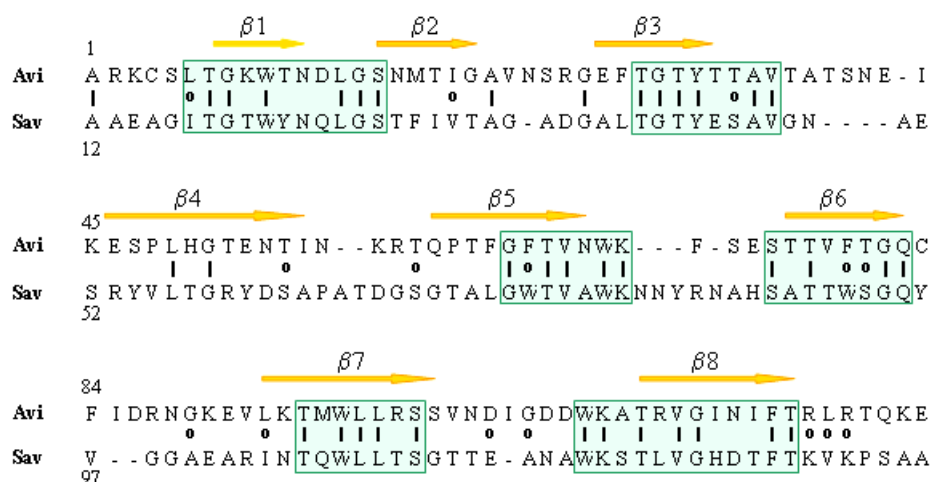


Figure I. 2.13 : Homologie entre l'avidine (Avi) et la streptavidine (Sav): les flèches représentent les feuillet β . Un trait vertical indique les résidus identiques. Un point indique les résidus homologues. Les zones qui présentent un fort taux d'identité sont encadrées.

Les différences majeures entre ces deux protéines se situent surtout au niveau des « loop » qui relient les feuillet β (figure I.2.14). 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.

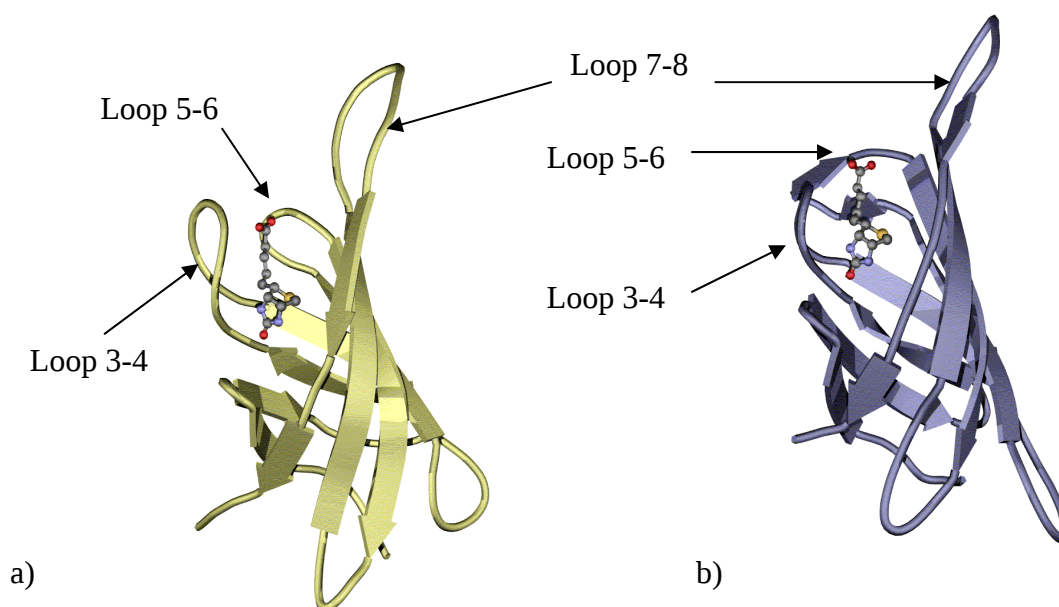


Figure I. 2.14 : Homologie structurale. a) En jaune un monomère d'avidine contenant une biotine b) En bleu un monomère de streptavidine contenant une biotine. Les 3 loop à proximité de la biotine sont indiqués.

2.3.3. Ancrage de la biotine : réseau de liaisons hydrogènes

La forte affinité de la (strept)avidine pour la biotine et ses dérivés^[167] s'explique par des interactions hydrophobes et par un large réseau de liaisons hydrogènes autour de la biotine (figure I.2.15).^[159, 166] Les liaisons hydrophobes sont assurées par des résidus tryptophanes et phénylalanines pour l'avidine (W70, F72, F79, W97, W110) et par quatre tryptophanes pour la streptavidine (W70, W92, W108, 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.^[163, 168]

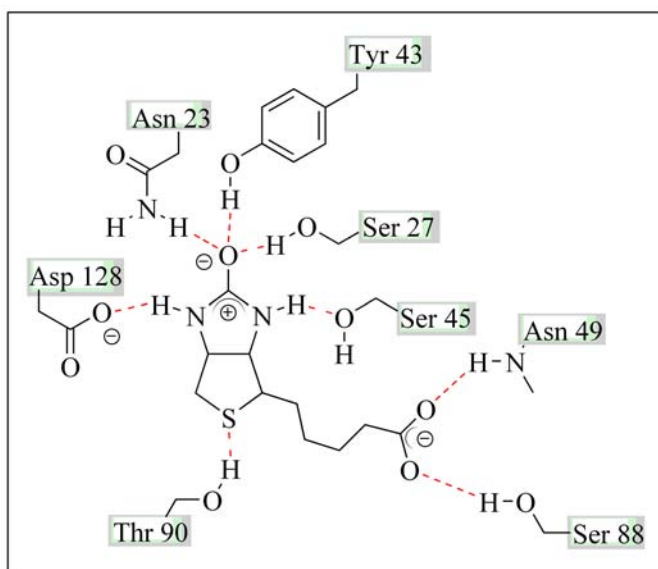
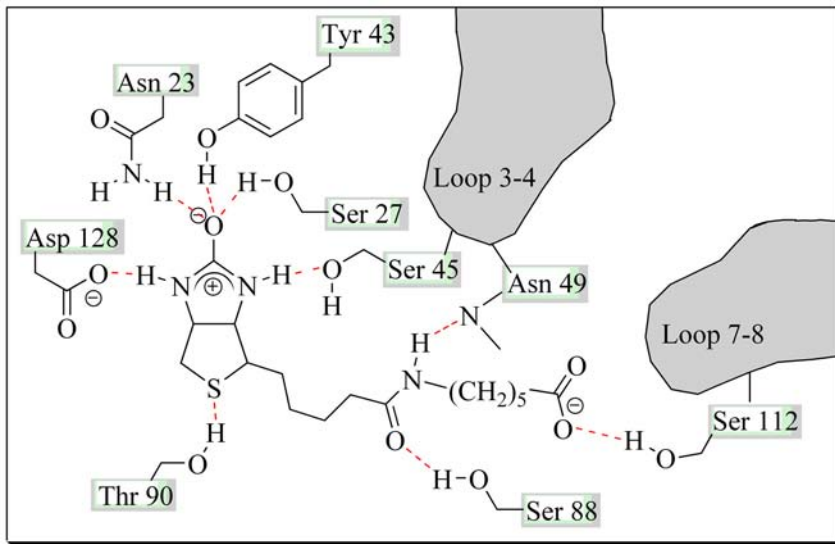


Figure I. 2.15 : Stabilisation de la biotine par le réseau de liaisons hydrogènes. Stabilisation du site oxyanion de l'urée dans la streptavidine (schéma basé sur ^[163, 165]).

Différents analogues de la biotine dont la fonction carboxylique a été modifiée, comme le Bcap, (figure I.2.16) se fixent parfaitement dans la cavité, car l'essentiel des liaisons hydrophobes ainsi que les liaisons hydrogènes autour de l'urée sont préservées.^[165] A l'inverse, une déstabilisation du réseau de liaisons hydrogènes abaisse fortement l'affinité. C'est le cas de l'iminobiotine qui possède un groupement NH à la place de l'oxygène au niveau de l'urée. Ce dérivé de biotine se fixe avec une bonne affinité dans la

d'affinité en utilisant une phase stationnaire d'iminobiotine greffée sur agarose.^[118]Exemple donné dans la streptavidine basé sur ^[165].

metalloenzymes artificielles.^[103, 126]

3. Le but de la thèse

Actuellement, le développement de nouveaux catalyseurs énantiosélectifs est une priorité pour la synthèse de composés optiquement purs. Idéalement, ces catalyseurs doivent pouvoir être facilement optimisés afin de s'inscrire dans une approche combinatoire par criblage à haut débit. Le but est de fournir, pour un substrat donné, l'outil le plus efficace dans les délais les plus courts.

De ce point de vue, le concept des catalyseurs hybrides combine avantageusement les caractéristiques de la catalyse homogène et enzymatique car il suppose une grande tolérance en terme de substrat et les deux énantiomères peuvent être obtenus. Le complexe organométallique assure l'activité catalytique ce qui permet de définir le type de transformation. Par une seconde sphère de coordination bien définie, l'enzyme assure la sélectivité et peut fournir une immense librairie de ligands chiraux grâce à des optimisations génétiques aléatoires ou rationalisées. Cette diversité est idéale pour un criblage à haut débit de ces catalyseurs.

Toutefois pour véritablement tirer partie de cette formidable diversité de ligands, le complexe doit être ancré facilement et de façon stable dans la protéine hôte. La stratégie d'ancrage non covalent, en particulier dans le système biotine-(strept)avidine, est bien adaptée à ces contraintes. Ces deux protéines fixent de manière quasiment irréversible les dérivés biotinylés. De plus, les très bons résultats obtenus précédemment pour l'hydrogénation asymétrique d'oléfines suggèrent que le « site actif », ou poche de fixation, est suffisamment large pour accueillir la partie organométallique, mais impose également suffisamment de contraintes pour induire de la sélectivité.

Dans la continuité des recherches développées au laboratoire, le but de cette étude est de créer une nouvelle génération de métalloenzymes artificielles. Basés sur le système biotine-(strept)avidine, ces catalyseurs hybrides sont destinés à la réduction énantiosélective des dérivés carbonyles cétoniques par transfert hydrogénant.

Les alcools chiraux sont des synthons couramment utilisés pour la synthèse de produits à haute valeur ajoutée. Le transfert hydrogénant, combiné à une protéine (milieu aqueux), s'inscrit directement dans le développement d'une « chimie verte ».

Ce travail se subdivise en deux grandes parties.

La première consiste à définir un système catalytique et à affiner les conditions de réaction. Dans un premier temps il est nécessaire de synthétiser différents ligands et complexes biotinylés aptes à réduire les cétones et qui soient compatibles avec le milieu protéique. Par la suite, il convient d'affiner les conditions opératoires (source d'hydrures, effet de sels, température, etc.) et de procéder à une optimisation chimique et génétique du système (les mutations génétiques sont réalisées par les biochimistes de notre laboratoire).

La deuxième partie s'attache à développer une approche rationnelle pour définir le site actif de l'enzyme artificielle. Une seconde variation chimique et génétique guidée par des expériences de « docking » est réalisée dans ce but. Ces expériences doivent permettre de rendre compte de certaines interactions, présentes au niveau du site actif, impliquées dans l'activité et la sélectivité du catalyseur hybride. Enfin, cette optimisation génétique est combinée avec une méthode de criblage efficace de manière à montrer comment cette nouvelle technologie peut s'orienter vers une optimisation combinatoire à haut débit.

- CHAPITRE II -

RESULTATS & DISCUSSION

1. Le système catalytique

Avant de concevoir un catalyseur hybride pour le transfert hydrogénant de cétones basé sur la technologie biotine – (strept)avidine, il est préalablement nécessaire de définir le système catalytique. Celui-ci doit être compatible avec la présence d'eau, de protéine. Cela requiert le développement de nouveaux ligands et complexes biotinylés ainsi que la mise au point des conditions de réaction.

1.1. Synthèse et évaluation des différents ligands et complexes

Plusieurs ligands biotinylés et leurs complexes sont synthétisés puis testés en transfert hydrogénant, d'abord en l'absence de protéine, afin d'estimer leur efficacité à réduire les cétones. Les sources d'hydrures, comme le formiate de sodium en milieu aqueux, l'isopropanol ou encore le mélange acide formique-triéthylamine, conviennent parfaitement pour estimer l'activité catalytique des complexes. L'acétophénone est utilisée comme substrat modèle lors des tests catalytiques.

1.1.1. Ligands de type amino-sulfonamide.

Inspiré par le TsDPEN (cf. abréviations et glossaire) décrit par Noyori^[59, 64, 94], le groupement tosyle est remplacé par le motif nitro-sulfonyle qui après réduction, en amine (3), permet de coupler la biotine au ligand par une liaison amide. Cette synthèse présente certains avantages. Elle permet des variations de structures du ligand en couplant la biotine

en position *ortho*, *méta* ou *para*, ainsi que l'introduction de différents chélates. Une telle variabilité est essentielle pour adapter et optimiser un système catalytique. De part son faible rendement, le couplage avec la biotine est l'étape limitante de la synthèse (figure II.1.1).

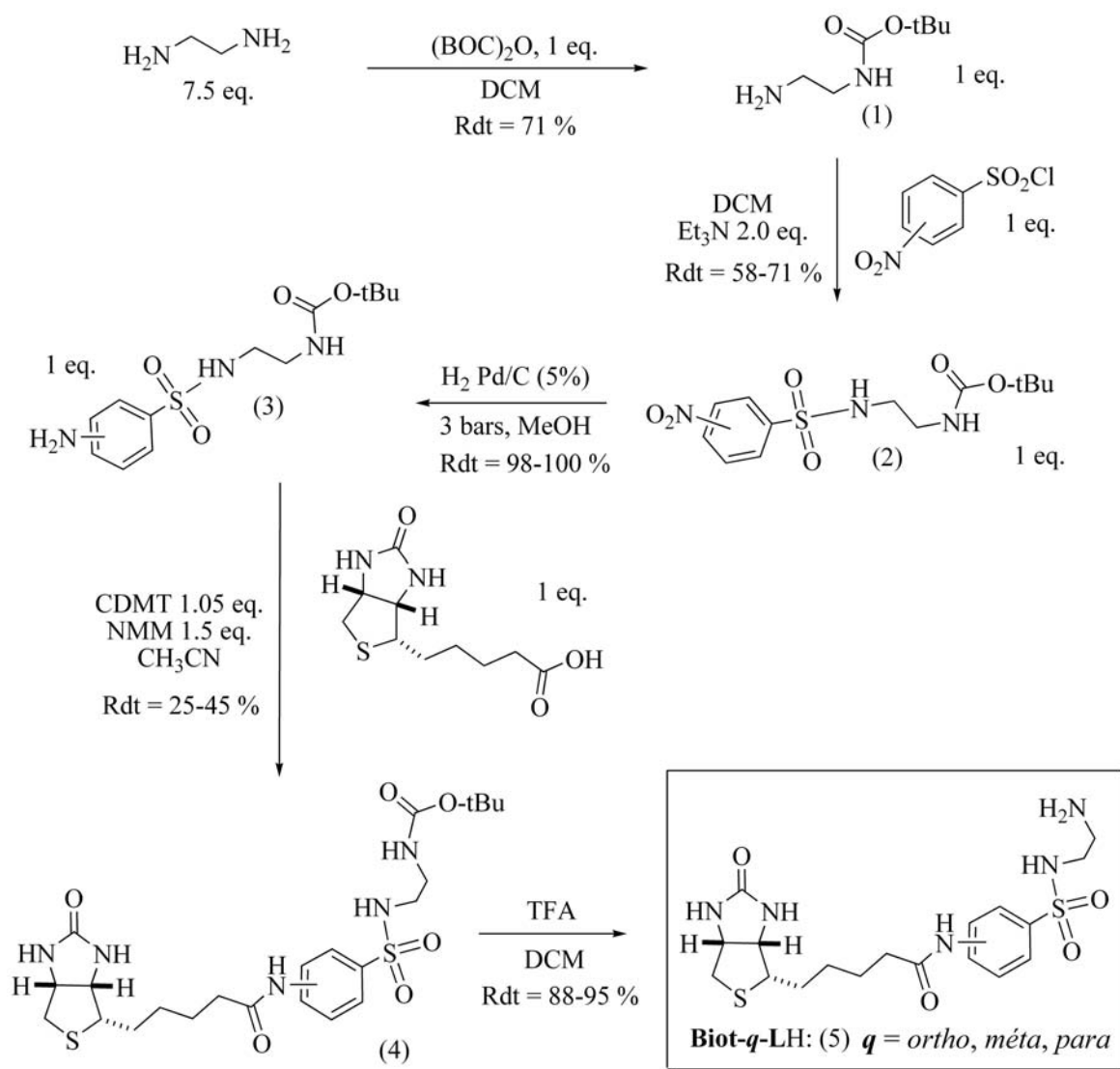


Figure II. 1.1 : Synthèse des ligands **Biot-*q*-LH** (5) de type amino-sulfonamide.

La faible nucléophilie de l'amine aromatique (3), d'autant plus désactivée par la présence du groupement sulfonamide électroattracteur, est le premier facteur qui explique les modestes rendements. D'autre part, le motif biotinylé qui est très polaire rend la purification délicate (solubilité faible dans des solvants autres que DMF, eau, méthanol).

Prenant en compte ces deux aspects, différentes méthodes de couplages sont évaluées pour la synthèse du ligand **Biot-*p*-LH** (tableau II.1.1).

Méthodes	Rendement brut (estimation)	Purification
Biotine-NHS (ester activé)	< 15 % Rdt	-
IBCF / DiPEA	35 % < Rdt < 50 %	Beaucoup de sous-produits
CDMT / NMM	35 % < Rdt < 50 %	Peu de sous-produits

Tableau II. 1.1 : Evaluation des méthodes de couplage de la biotine pour la synthèse du ligand **Biot-*p*-LH**.

Aux vues des trois méthodes utilisées, le couplage avec CDMT est le plus intéressant. Le rendement obtenu est supérieur ou équivalent aux deux autres méthodes et la réaction génère moins de sous-produits, rendant la purification par chromatographie sur silice plus aisée. Par cette méthode, les rendements sont de 40 % après purification.

Afin de s'assurer que ces ligands conviennent pour le transfert hydrogénant, le complexe $[\eta^6-(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ (6) (figure II.1.2) est synthétisé^[64], à partir du dimère d'arène ruthénium $[\eta^6-(p\text{-cymène})\text{RuCl}_2]_2$, puis testé en catalyse.

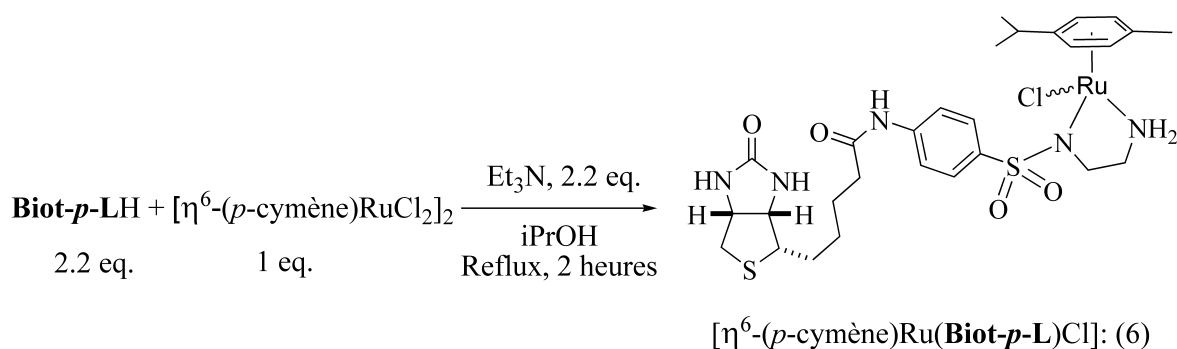


Figure II. 1.2 : Préparation du complexe biotinylé en tabouret de piano $[\eta^6-(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ (6).

Afin d'évaluer le complexe $[\eta^6-(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ (6) pour le transfert hydrogénant de cétones, il est comparé avec le $[\eta^6-(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{TsDPEN})\text{Cl}]$ dans les

mêmes conditions de réaction. L'activité catalytique est confirmée visuellement par simple chromatographie sur couche mince (CCM), sous une lampe UV. Comparativement, la réduction de l'acétophénone à 40°C avec la source d'hydrures acide formique – triéthylamine est quantitative après 55 heures avec le complexe biotinylé (6) contre 45 heures pour le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru (TsDPEN)Cl}]$.

Avec le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-p-L)Cl}]$ (6), la catalyse s'avère aussi efficace dans l'isopropanol ou en présence de formiate de sodium dans l'eau comme autres sources d'hydrures. Ce type de ligand biotinylé convient donc parfaitement pour la réduction de cétones par transfert hydrogénant.

1.1.2. Ligand de type bipyridine

Ce type de complexe, utilisant un dérivé de bipyridine (bipy), est inspiré des travaux de S. Ogo.^[61, 74] Le ligand bipyridine biotinylé (figure II.1.3 : **Biot-bipy**) a été synthétisé dans notre laboratoire pour une étude sur la coopérativité des sites actifs de la protéine par les docteurs A. Loosli et J. Gradinaru.^[169, 170] Pour la synthèse du complexe, le dérivé de bipyridine (**Biot-bipy**) est directement ajouté au complexe de ruthénium cationique hydraté (tris-aqua) obtenu *in situ* dans l'eau en présence de sulfate d'argent, à partir du dimère hexaméthylbenzène ruthénium chlorure (figure II.1.3). L'hexaméthylbenzène (C_6Me_6) est sélectionné comme ligand arène car, selon les publications de S. Ogo, le complexe $[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6\text{)Ru(bipy)H}_2\text{O}]^{2+}$ est très efficace en transfert hydrogénant de cétones, en présence de formiate de sodium.

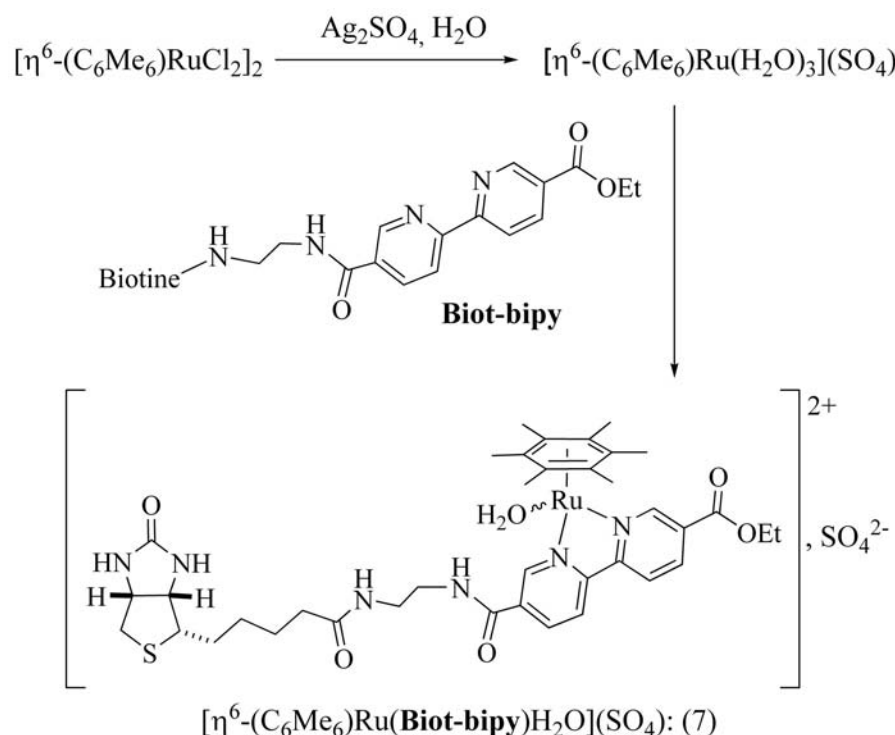


Figure II. 1.3 : Synthèse du complexe $[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6\text{)Ru(Biot-bipy)H}_2\text{O}]^{2+}$ (7).

Le complexe $[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6\text{)Ru(Biot-bipy)H}_2\text{O}]^{2+}$ (7) est testé en transfert hydrogénant en présence de formiate de sodium (à pH = 4.5) et d'acétophénone comme substrat. Testé à 70°C ce complexe réduit quantitativement l'acétophénone en moins de 28 heures, alors qu'à une température de 40°C, seul 30 % de 1-phényléthanol est produit en 50 heures (conversion déterminée par RMN). De même que le catalyseur décrit par S. Ogo et al., l'activité catalytique de ce complexe est faible à une température inférieure à 65°-70°C.

1.1.3. Comparaison entre les deux types de complexes

Ces deux complexes biotinylés sont capables de réduire l'acétophénone en transfert hydrogénant. Néanmoins, dans les mêmes conditions de réaction, à 40°C, l'activité catalytique du complexe $[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6\text{)Ru(Biot-bipy)H}_2\text{O}]^{2+}$ (7) s'avère inférieure à celle observée avec le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (6). La synthèse des ligands de type amino-sulfonamide (**Biot-*p*-LH**) peut être aisément adaptée ce qui permet une plus

grande variabilité de structure des ligands. Dans l'étape suivante ces deux types de complexes sont testés en présence de (strept)avidine.

1.2. La catalyse en présence de protéine : conditions de réaction

Nous disposons désormais de deux types de complexes (bipyridine et amino-sulfonamide) capables de s'ancrer dans la (strept)avidine de façon à former des métalloenzymes artificielles. La formation de ces catalyseurs hybrides par l'ancrage non covalent du complexe organométallique biotinylé dans la protéine hôte est présentée dans la figure II.1.4.

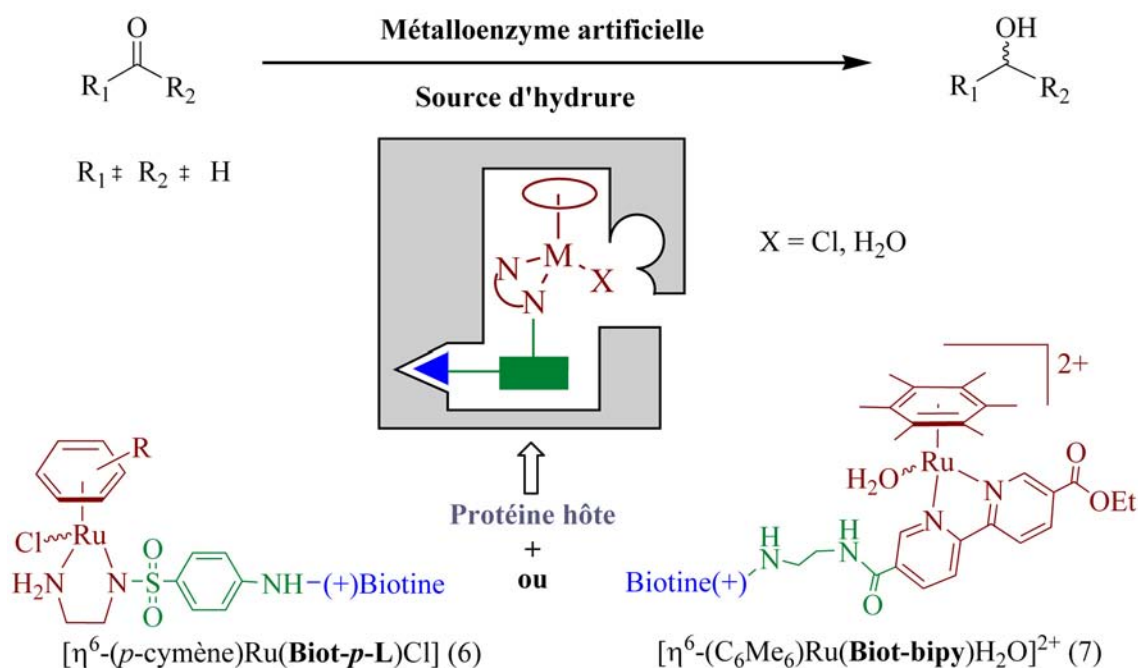


Figure II. 1.4 : Métalloenzymes artificielles pour la réduction asymétrique de cétones par transfert hydrogénant.

L'acétophénone et ses dérivés sont choisis comme substrats modèles pour étudier la réduction asymétrique de cétones, en transfert hydrogénant, par les métalloenzymes artificielles. Afin d'évaluer les deux types de complexe, le $[\eta^6-(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ (6) et le $[\eta^6-(\text{C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{Biot-bipy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (7) sont testés en catalyse en présence de

streptavidine (Sav Wt). Utiliser une protéine impose la présence d'eau dans le milieu réactionnel. Il convient alors d'évaluer les différentes sources d'hydrures en milieu aqueux et de tester leur influence sur la protéine et la catalyse.

1.2.1. Sources d'hydrures

Trois sources d'hydrures sont employées pour le transfert hydrogénant. L'isopropanol en présence d'une base alcaline (KOH ou tBuOK), le mélange azéotropique, acide formique – triéthylamine, ou encore le formiate de sodium dans l'eau. Les trois sont mises en présence de protéine (milieu aqueux) avec le complexe $[\eta^6-(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ et l'acétophénone comme substrat (ratio substrat / catalyseur : S / C = 100 à 45°C). Pour ces tests, la streptavidine type sauvage (Sav Wt) est utilisée.

- Isopropanol / tBuOK :

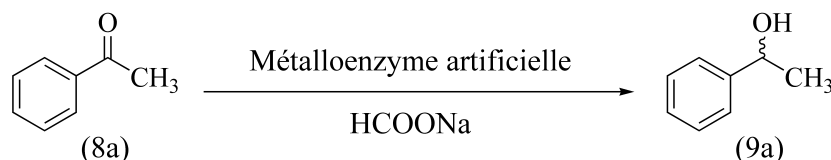
Au-delà de 45 % d'isopropanol dans l'eau (v /v), la protéine précipite. A un pourcentage égal ou inférieur à 45 %, l'activité catalytique est faible même après 45 heures de réaction. Cette source d'hydrures n'est donc pas compatible avec les metalloenzymes artificielles.

- Acide formique-triéthylamine :

D'une manière surprenante, la protéine reste parfaitement soluble après l'ajout du mélange organique acide formique – triéthylamine et forme une solution jaune translucide. Toutefois avec ce mélange, aucune trace de produit réduit n'est détectée après 45 heures de réaction à 45° C. Le mélange acide formique – triéthylamine ne convient donc pas comme source d'hydrures.

- Formiate de sodium dans l'eau :

Le formiate de sodium est ajouté à la protéine dissoute dans l'eau, directement sous forme de sel. Cette source d'hydrures est testée avec les deux complexes. Les différents résultats sont regroupés dans le tableau II.1.2.



Entrée	Complexe	HCOONa (mol/l)	Ratio S / C	Conv. (%)	Ee (%)
1 ^a	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	2.25	200	25	25 (R)
2 ^a	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	1.50	200	18	27 (R)
3 ^{a, b}	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	1.50	200	43	0
4	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	1.50	100	43	26 (R)
5	$[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6\text{)Ru(Biot-bipy)H}_2\text{O}]^{2+}$	1.50	100	2	8 (R)
6 ^c	$[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6\text{)Ru(Biot-bipy)H}_2\text{O}]^{2+}$	1.50	100	58	10 (R)
7 ^a	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	-	100	0	-
8 ^{a, d}	Pas de complexe	1.50	-	0	-

Tests catalytiques réalisés sous azote en piluliers fermés avec la protéine Sav Wt, dans l'eau pour un volume total de 905 μL à 45° C durant 45 heures. a) Temps de réaction de 65 heures. b) Réaction réalisée sans protéine. c) Réaction menée en tube ouvert, à 65° C, durant 65 heures à pH = 4.5. d) Réaction réalisée sans complexe, avec une quantité de substrat identique aux entrées 4 à 7. Ratio S / C = mole de Substrat / mole de Catalyseur.

Tableau II. 1.2 : Evaluation du formiate de sodium comme source d'hydrures, en présence de Sav Wt et des complexes $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (6) et $[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6\text{)Ru(Biot-bipy)H}_2\text{O}]^{2+}$ (7).

Cette source d'hydrures convient parfaitement pour le transfert hydrogénant par les métalloenzymes artificielles et on observe une induction asymétrique jusqu'à 27 % ee (entrée 2). En l'absence de protéine, aucun excès énantiomérique n'est observé (entrée 3).

Ce fait établit que la sélectivité est induite par la protéine hôte qui assure un environnement chiral, de seconde sphère de coordination, autour du métal. En l'absence de complexe (entrée 8) ou de source d'hydrures (entrée 7), aucune conversion n'est observée. Cela confirme que l'activité catalytique est assurée par le complexe organométallique et que le formiate de sodium est nécessaire à la réduction.

En comparant les concentrations de formiate (entrées 1 et 2) on constate que la sélectivité et la conversion sont comparables dans les deux cas. Néanmoins, il faut préciser que lors de ces tests, un précipité s'est formé au cours de la catalyse. Ce précipité est beaucoup plus important pour l'échantillon à 2.25 M en formiate (entrée 1) et suggère une dénaturation partielle de la protéine dans ces conditions de catalyse.

Le complexe $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru}(\mathbf{Biot-p-L})\text{Cl}]$ (6) surpasse largement le complexe $[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6\text{)Ru}(\mathbf{Biot-bipy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (7) dans les mêmes conditions (entrées 4 et 5). Comme nous l'avons préalablement observé en l'absence de protéine, l'activité catalytique des complexes de type bipyridine est faible à une température inférieure à 65°C. Malheureusement, même dans des conditions optimales (pH = 4 à 65° C) après 65 heures (entrée 6), ce complexe montre une conversion encore moyenne et une sélectivité faible (conversion = 58 % et ee = 8 % (R)). De plus, de telles conditions de température, prolongées, conduisent à la formation de quantité importante de précipité. En définitive, ce complexe (7) apparaît peu approprié à l'étude des métalloenzymes artificielles pour le transfert hydrogénant asymétrique et ne sera plus étudié par la suite.

Sur cette base et dans le but de déterminer les conditions de réaction les plus favorables à ce système hybride, certains paramètres comme le pH et la concentration de la source d'hydrures sont examinés avec le complexe $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru}(\mathbf{Biot-p-L})\text{Cl}]$ (6).

1.2.2. Influence de la concentration de formiate sur la catalyse

Pour de nombreux systèmes de transfert hydrogénant, le nombre d'équivalents de formiate mis en jeu influence la conversion.^[61, 91] Compte tenu de la présence de la protéine, il est indispensable de trouver un bon compromis entre une conversion optimale, assurée par un nombre d'équivalents de formiate suffisant, et une concentration en sel aussi faible que possible afin de conserver l'intégrité de la protéine et un milieu de réaction homogène durant toute la catalyse. La protéine assurant la sélectivité de notre système, il

est indispensable de s'assurer qu'elle ne se dénature pas au cours de la catalyse, de manière à maintenir un environnement chiral identique autour du complexe du début à la fin de la réaction. Cela implique qu'elle soit fonctionnelle, c'est-à-dire apte à fixer le complexe biotinylé, mais également que sa structure quaternaire soit inchangée (tétramérique) en fin de catalyse.

Un gel électrophorèse non dénaturant^[118, 171] permet de contrôler « l'état » de la protéine après la catalyse en séparant les protéines en fonction de leur charge, de leur masse respective et de leur état de repliement. La streptavidine fonctionnelle, non dénaturée, est tétramérique et présente une mobilité électrophorétique différente de la streptavidine dénaturée (monomère, dimère). L'état de dénaturation de la protéine, des échantillons correspondant aux entrées 1 et 2 du tableau II.1.2, est évalué après la catalyse (figure II.1.5).

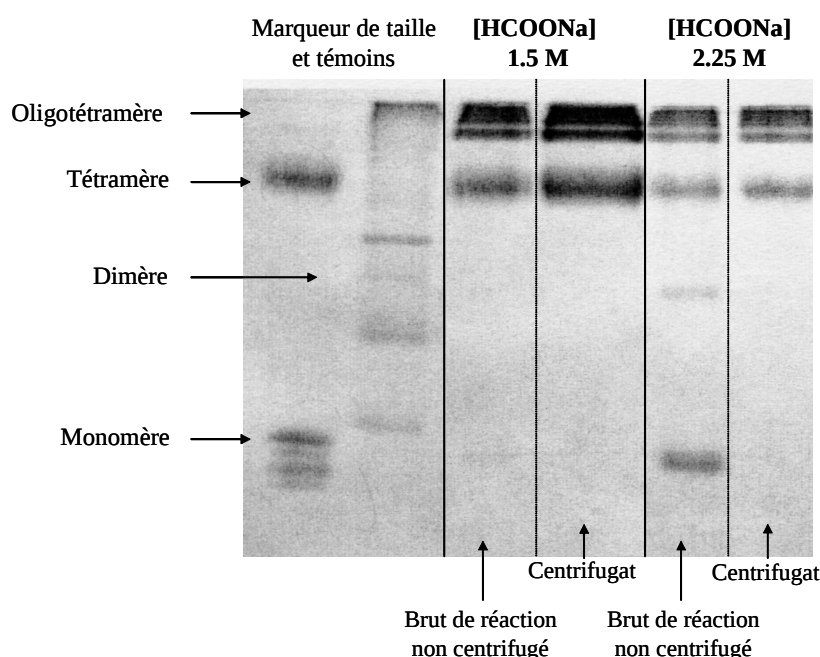


Figure II. 1.5 : Evaluation de l'état de dénaturation de la protéine Sav Wt par un gel électrophorèse non dénaturant après une catalyse réalisée avec $[\eta^6-(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{Sav Wt}$ à 45°C pendant 65 heures.

Sur la base du gel électrophorétique (figure II.1.5), nous concluons qu'une concentration de 2.25 M en formiate de sodium est trop importante et conduit à la formation de précipité constitué de sels mais également de protéine dénaturée (échantillon

non centrifugé correspondant au brut de catalyse). Dans ce brut de réaction, on peut observer une bande intense de monomère et une trace de dimère. La fraction soluble (centrifugat) ne contient que du tétramère fonctionnel. Une concentration de 1.5 M en formiate de sodium s'avère être moins dénaturante, car seule une légère trace de monomère est observée dans le brut de réaction. Les bandes situées au dessus du tétramère, les oligotétramères, sont parfois symptomatiques de la présence d'un complexe biotinylé dans la protéine. Cette bande suggère que la protéine est encore fonctionnelle en fin de catalyse. De manière à se placer avec certitude dans des conditions non dénaturantes, il convient de travailler avec des concentrations inférieures ou égales à 1.0 M en formiate de sodium, considérant qu'une concentration de 1.5 M est la limite des conditions non dénaturantes tolérables. Pour s'assurer qu'une telle diminution de concentration en formiate ne nuit pas à l'activité catalytique, le nombre d'équivalents de formiate de sodium est varié afin de trouver les conditions optimales.

Dans le tableau II.1.2, avec le ratio $S / C = 200$, une concentration en formiate de 2.25 M correspond à un rapport $HCOONa / S = 75$, une concentration de 1.5 M correspond à $HCOONa / S = 50$. Avec le ratio $S / C = 100$, une concentration de 1.5 M donne un rapport de $HCOONa / S = 100$.

Pour maintenir le milieu de la catalyse homogène, tout en conservant un nombre d'équivalents de formiate suffisant pour une conversion optimale, l'influence des équivalents de formiate sur la conversion est évaluée pour le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (6), en l'absence de protéine. Ces tests sont réalisés en l'absence de protéine afin d'être certain que la limitation de la conversion provient de la concentration de $HCOONa$ et non de la protéine hôte. La réduction catalytique de l'acétophénone (8a) est réalisée dans l'eau avec différentes concentrations de formiate de sodium (figure II.1.6) en présence du complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ à 45° C durant 45 heures.

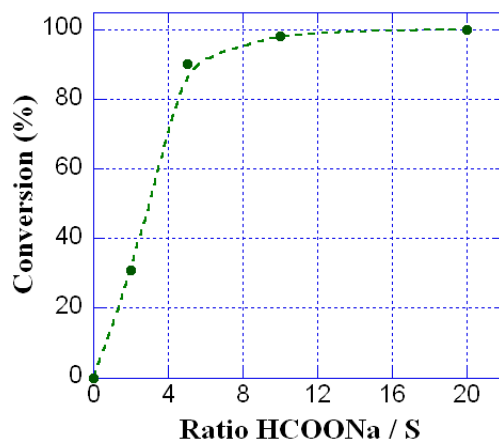


Figure II. 1.6 : Influence du ratio HCOONa / S sur la conversion.

D'après la figure II.1.6, le nombre d'équivalents de formiate influence la conversion et 20 équivalents de formiate suffisent à assurer une conversion maximale en l'absence de protéine.

Avec des concentrations en complexe et substrat maintenues constantes, des tests de dilution montrent qu'avec une concentration inférieure à 0.5 M en formiate, même en maintenant un ratio $\text{HCOONa} / \text{S} = 40$, la conversion chute. Une concentration de sel comprise entre 0.5 M et 1.0 M (pour un volume de 1 mL) doit permettre à la fois une bonne stabilité de la protéine sans limiter la conversion. Ces concentrations correspondent au minimum à plus de 35 équivalents de formiate par rapport au substrat pour un ratio $\text{S} / \text{C} = 100$.

1.2.3. Influence du pH sur la catalyse

Si l'on considère le mécanisme de la réaction de transfert hydrogénant, chaque mole de substrat réduit consomme formellement une mole d'acide formique (un hydrure et un proton sont nécessaires) et libère une mole de CO_2 . Le pH augmente au cours de la réaction et son effet sur la catalyse doit être pris en considération. L'influence du pH est présentée figure II.1.7.

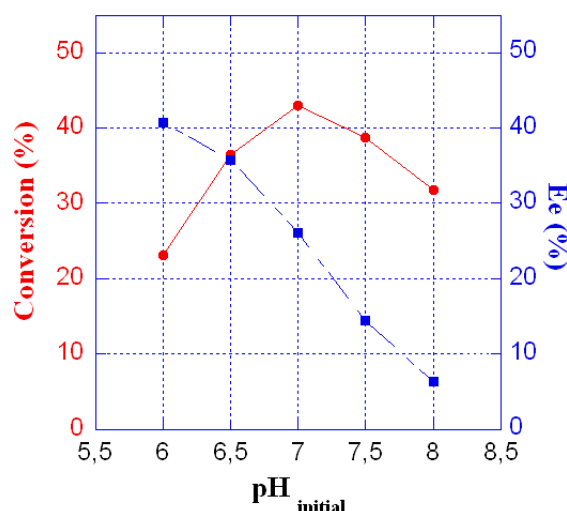


Figure II. 1.7 : Influence du pH sur la catalyse avec $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-p-L)Cl}] \subset \text{Sav Wt}$ à 45°C pendant 45 heures et $[\text{HCOONa}] = 1.5 \text{ M}$.

D'après les résultats de la figure II.1.7, le pH influe à la fois sur la conversion et la sélectivité des métalloenzymes artificielles. Un bon compromis entre sélectivité et conversion se situe aux alentours de $\text{pH} = 6.5$. De manière à maintenir le pH, plusieurs tampons sont testés comme le MES, le MOPS et le BisTris. Tamponner une concentration importante de formiate de sodium (1 M) nécessite des quantités au moins équivalentes de tampon et représente une concentration finale en sels trop élevée, incompatible avec la protéine. Pour remédier à cela, le formiate de sodium est utilisé à une concentration plus faible de 0.5 M en association avec de l'acide borique également à 0.5 M. Ce mélange sert à la fois de source d'hydrures et agit comme une solution tampon mixte, dont le $\text{pKa}' = 0.5 \times (\text{pKa}_{\text{acide formique}} + \text{pKa}_{\text{Acide Borique}}) = 6.5$.

La base des conditions opératoires étant fixée, un protocole est établi pour le transfert hydrogénant.

1.3. Protocole du transfert hydrogénant par les métalloenzymes artificielles

1.3.1. Quantification des sites actifs des protéines hôtes

L'avidine et la streptavidine possèdent chacune quatre sites capables de fixer la biotine ou ses dérivés. En réalité, lors de la production de (strept)avidine, de la biotine est présente dans le milieu de culture et se fixe dans la protéine. Bien que différentes étapes de dénaturation et dialyses successives permettent d'en éliminer la majeure partie, une certaine quantité de biotine occupe toujours quelques sites. Afin d'être certain que tous les complexes biotinylés sont fixés par la protéine, on introduit un défaut de complexe par rapport au nombre de sites qu'il faut déterminer au préalable. La titration des sites actifs est réalisée par les biologistes de notre équipe par fluorescence à l'aide de la biotine-4-fluorescéine (figure II.1.8) ou par lecture de l'absorbance à 506 nm pour le titrage réalisé avec HABA (figure II.1.8).^[118]

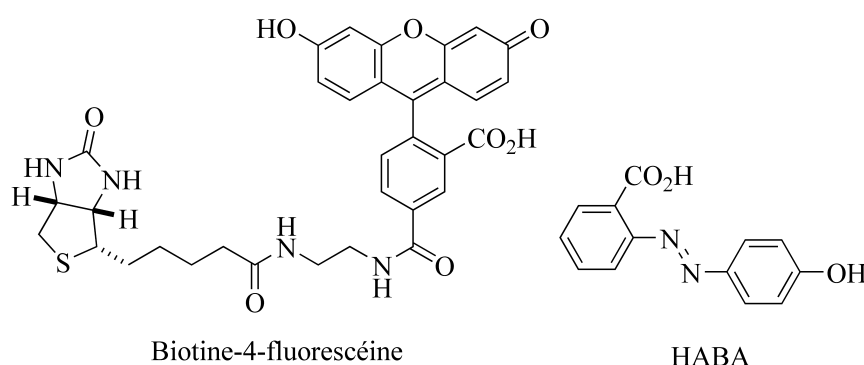


Figure II. 1.8 : Structure de la biotine-4-fluorescéine et de HABA (acide 2-(4'-hydroxyazobenzène)-benzoïque).

La biotine-4-fluorescéine ne fluoresce plus lorsqu'elle est fixée dans la protéine. Ainsi l'ajout successif de ce réactif permet de tracer une courbe dont le point d'inflexion correspond à l'équivalence de sites actifs pour une masse donnée de protéine. Avec le HABA, il s'agit d'un titrage indirect. Ce réactif se fixe dans la (strept)avidine avec une affinité faible (10^3 M^{-1}) pour former un complexe qui absorbe à 506 nm. Une fois la protéine saturée par HABA, l'ajout de biotine déplace quantitativement le HABA fixé. Au

fur et à mesure des ajouts, l'absorbance à 506 nm diminue jusqu'à un point minimal correspondant au nombre de sites actifs par masse de protéine.

Une fois le nombre de sites actifs connus, par masse de protéine, il est possible de calculer la masse molaire apparente de la protéine (M_x) correspondant à 4 sites actifs.

Un exemple de calcul est donné pour la streptavidine Wt de masse molaire $M = 65700$ Da et pour un nombre de sites actifs : Nbre Site = 3.7.

$$\begin{aligned} M_x &= (M \times 4) / \text{Nbre Site} \\ &= (65700 \times 4) / 3.7 \\ &= 71027 \text{ Da} \end{aligned}$$

Connaissant la masse molaire apparente (M_x) pour 4 sites actifs, une masse de protéine prélevée permet de calculer le nombre de moles de sites actifs.

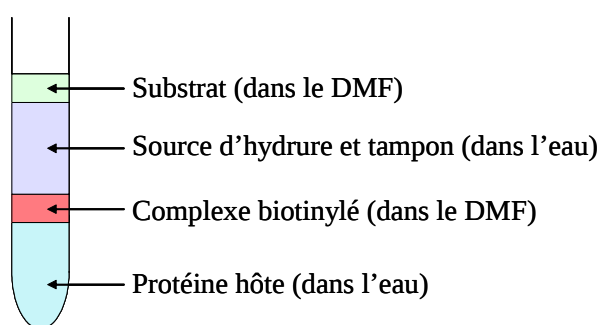
$$X \text{ moles de protéine} = 4 X \text{ moles de sites actifs.}$$

Pour être certains qu'aucun complexe biotinylé ne se trouve hors de la protéine durant la catalyse, le complexe est ajouté en défaut par rapport au nombre de sites actifs. Des tests en fonction du nombre d'équivalents de complexe montrent que la sélectivité varie peu de 1 à 4 équivalents avec un maximum autour de 3.5 eq. et baisse légèrement à partir du cinquième (annexe 1). Ainsi, 3.4 équivalents de complexe biotinylé sont ajoutés.

1.3.2. Mise en œuvre de la catalyse

Bien que cette réaction soit modérément sensible à la présence d'oxygène – une diminution maximale de 30 % de conversion est observée pour une catalyse réalisée sans précautions – toutes les solutions utilisées sont préalablement désoxygénées par un bullage d'azote. Après purification, la protéine est lyophilisée et se présente sous forme de poudre blanche floconneuse que l'on dissout dans l'eau. Cette solution de protéine, environ 5 à 6 mg / mL, est désoxygénée par un bullage d'azote pendant 45 min. Le complexe biotinylé est préparé puis utilisé tel quel. Sous forme de poudre, il peut être stocké sous azote durant

des mois sans observer de diminution de l'activité catalytique. Pour la catalyse, une partie aliquote de complexe est prélevée et solubilisée dans le DMF pour une concentration de la solution stock d'environ 0.039 M. Une solution stock de substrat est également préparée dans le DMF à une concentration 1 M. De cette façon, il y a un minimum de solvant organique dans le milieu de catalyse (moins de 1.5 % de DMF (v /v) pour un volume total de 1.2 à 1.3 mL). Les solutions de formiate ou tampon sont préparées dans l'eau et ajustées à pH = 6.25 avec des pastilles de soude broyées. La concentration finale, par tube de catalyse, est de 0.5 M en formiate de sodium et de 0.45 M en acide borique. Lors de la catalyse les réactifs sont ajoutés en séquence selon la figure II.1.9.



Tube de catalyse

Figure II. 1.9 : Séquence d'ajout des réactifs dans le tube de catalyse du multi-réacteur.

La réaction dégageant du CO₂, les catalyses sont effectuées dans un réacteur ouvert, sous atmosphère inerte (figure II.1.10), afin de déplacer l'équilibre en favorisant l'élimination de CO₂ (pour ne pas limiter la conversion). Après avoir chargé les réactifs, le réacteur est fermé, purgé par 3 cycles de vide et azote successifs et finalement maintenu ouvert sur une ligne d'azote possédant une colonne de mercure capable d'évacuer une surpression sans être contaminé par l'oxygène extérieur (ligne de Schlenk).



Figure II. 1.10 : Multi-réacteur 24 puits avec un système de reflux et une entrée d'azote (Radley's)

En fin de réaction le produit et le substrat, peu solubles dans l'eau, sont facilement récupérés par une extraction à l'éther (3 à 4 x 1 mL). L'analyse des résultats est effectuée par GC ou HPLC chirales. Une colonne chirale pour GC est sensible à la présence de sels ou de métaux, dont l'accumulation détériore rapidement la séparation des énantiomères. Afin d'éviter ce problème, les extraits étherés sont préalablement filtrés sur silice avant l'injection en GC. De manière à s'assurer qu'il n'y a pas d'enrichissement énantiomérique lors de cette purification, la totalité des produits et substrats sont élués à l'éther ($R_{f \text{ moyen}} = 0.9$). Des comparaisons, réalisées entre des échantillons filtrés et non filtrés, montrent que la conversion et l'excès énantiomérique sont identiques et qu'il n'y a pas d'enrichissement en produit ou en substrat lors de cette étape de purification.

2. Première évolution chimique et génétique

Les conditions réactionnelles imposées par le système catalytique étant définies, ces métalloenzymes peuvent être systématiquement testées en catalyse afin de cerner le potentiel de ce nouveau type de catalyseur (énantiosélectivité, activité, interaction de seconde sphère de coordination). 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. Humbert, le Dr. Zocchi ainsi que Mme Ivanova.

2.1. Diversité chimique

La diversité chimique est apportée par 3 différents ligands biotinylés (5), avec un positionnement différent de la biotine, en *ortho*, *méta* ou *para* sur l'espaceur aromatique. Ces 3 ligands sont combinés avec le ruthénium portant le *p*-cymène comme ligand arène. Ces trois points d'accrochage de la biotine conduisent à une modification de la structure du complexe (angle entre la biotine et le métal), ce qui laisse supposer un positionnement différent de celui-ci dans la protéine. Une telle variation de l'environnement autour du centre catalytique devrait conduire à une grande diversité.

Un autre ligand arène, le benzène qui est moins encombré que le *p*-cymène, est testé en association avec le ligand **Biot-*p*-LH**.

Ces différentes combinaisons (figure II.2.1) sont évaluées en catalyse avec la (strept)avidine selon les conditions et le protocole établi précédemment.

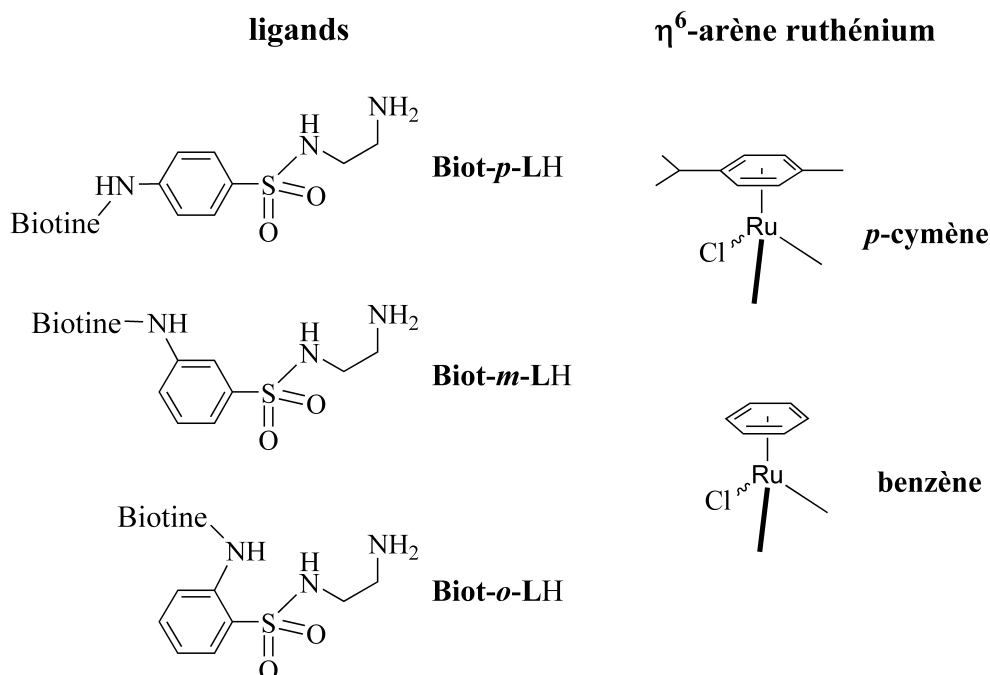
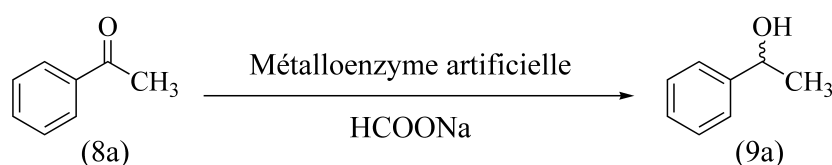


Figure II. 2.1 : Diversité chimique avec différents ligands biotinylés (*ortho*, *méta*, *para*) et deux ligands arène sur le ruthénium (benzène et *p*-cymène).

Le transfert hydrogénant asymétrique est testé sur l'acétophénone (8a) avec la protéine Sav Wt et l'avidine de type sauvage (Avi Wt) (tableau II.2.1).



Entrée	Ligand	η^6 -arène	Protéine	Conv. (%)	Ee (%)
1 ^a	Biot-<i>p</i>-LH	<i>p</i> -cymène	Sav Wt	51	28 (<i>R</i>)
2 ^b	Biot-<i>p</i>-LH	<i>p</i> -cymène	Sav Wt	55	57 (<i>R</i>)
3 ^b	Biot-<i>p</i>-LH	<i>p</i> -cymène	Avi Wt	24	22 (<i>R</i>)
4 ^b	Biot-<i>m</i>-LH	<i>p</i> -cymène	Sav Wt	20	6 (<i>S</i>)
5 ^b	Biot-<i>o</i>-LH	<i>p</i> -cymène	Sav Wt	18	3 (<i>S</i>)
6 ^b	Biot-<i>p</i>-LH	benzène	Sav Wt	29	56 (<i>S</i>)
7 ^b	Biot-<i>p</i>-LH	benzène	Avi Wt	17	17 (<i>R</i>)

Les réactions sont réalisées à 45° C durant 40 heures à un pH_{initial} = 6.25, avec un ratio HCOONa / S / C = 4200 / 100 / 1. a) Solution de formiate à 0.5 M, sans tampon. b) Tampon mixte HCOONa (0.5 M) + B(OH)₃ (0.45 M).

Tableau II. 2.1 : Tests catalytiques pour l'optimisation chimique.

Testés en l'absence de protéine, tous ces complexes produisent le 1-phényléthanol (9a) en mélange racémique.

Les entrées 1 et 2 indiquent que l'emploi du tampon mixte (formiate / acide borique) permet de stabiliser le pH, favorisant ainsi une meilleure sélectivité tout en préservant la conversion.

En examinant les résultats des entrées 2, 4 et 5, il apparaît que le ligand **Biot-*p*-LH** surpasse largement les ligands *ortho* et *méta*. Une baisse conséquente de la conversion suggère que le repliement imposé par le couplage de la biotine en *méta* ou *ortho* positionne le métal de façon à le rendre moins accessible au substrat. La sélectivité est également moindre (ee = 3 % et 6 % en faveur de l'énantiomère (*S*)) ce qui implique un environnement peu sélectif, différent de celui imposé avec le ligand *para* (**Biot-*p*-LH**).

La streptavidine est une meilleure protéine hôte pour les métalloenzymes artificielles. Avec l'avidine, un même complexe est moins actif et moins sélectif (entrées 2 vs. 3 et 6 vs. 7).

De manière surprenante, avec la streptavidine comme protéine hôte, le remplacement du *p*-cymène par le benzène inverse la sélectivité (entrées 2 et 6). Avec l'enzyme artificielle $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{Sav Wt}$ on obtient un excès énantiomérique de 57 % en faveur du produit (*R*) (9a) alors que le catalyseur $[\eta^6\text{-(benzène)}\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{Sav Wt}$ produit le 1-phényléthanol (9a) avec un excès énantiomérique de 56 % en faveur de l'énantiomère (*S*).

Ayant identifié le ligand biotinylé le plus performant avec **Biot-*p*-LH** et une inversion de la sélectivité due au changement de ligand arène sur le ruthénium, il est intéressant d'envisager une optimisation génétique avec ces deux combinaisons (arène – ligand).

2.2. Diversité génétique

La glycine est le plus petit acide aminé naturel, non chiral, qui par l'absence de chaîne latérale ($R = H$) possède la propriété de laisser des degrés de liberté plus importants pour les angles ψ et Φ d'une liaison peptidique. En règle générale, 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.

Quatre positions sont mutées dans la streptavidine (figure II.2.2). Les mutants créés sont V47G, K80G, S112G, P64G et un double mutant S112G-P64G. - Dans le nom d'un mutant, on retrouve en première lettre l'acide aminé échangé (V47G), suivie de sa position (V47G) et le code de l'acide aminé qui le remplace en dernière lettre (V47G).- Ces 5 mutants sont testés en catalyse.

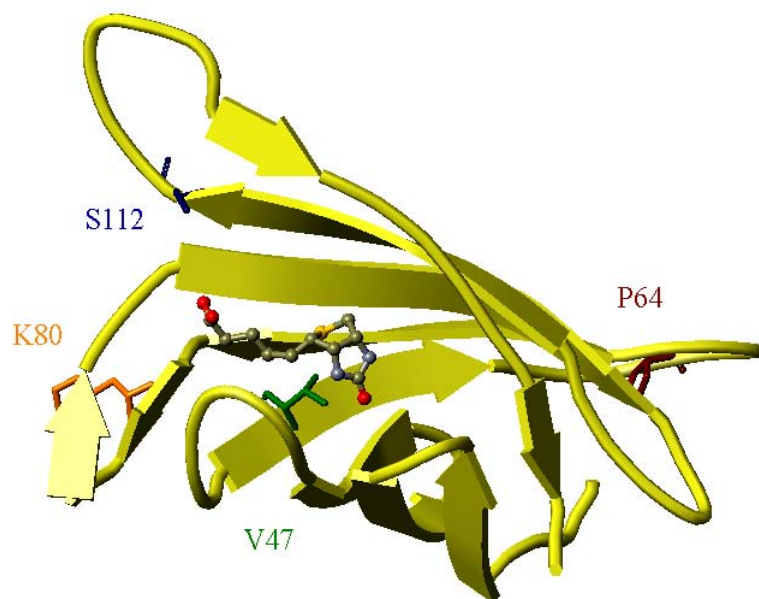


Figure II. 2.2 : Positions des mutations dans la streptavidine (Sav Wt). Un seul monomère, contenant la biotine, est représenté.

En estimant la taille du complexe $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$, la valine V47 est une mutation distante de la position supposée du métal dans la protéine. Cependant elle se trouve à proximité des acides aminés (S45 et Y43) directement impliqués dans la fixation de la biotine au niveau de l'urée qui est largement responsable de l'ancrage dans la protéine. Sans empêcher la fixation du dérivé biotinylé, une mutation à ce niveau peut modifier le positionnement du complexe dans la protéine et induire ainsi des variations en catalyse.

La lysine K80 se trouve dans le loop 5-6 qui tend à se refermer vers la poche contenant la biotine. La lysine est un acide aminé chargé, propice à former des liaisons hydrogènes et son remplacement par une glycine peut avoir des répercussions sur la catalyse.

La sérine S112 est à la base du loop 7-8 qui s'ouvre sur la cavité. L'apport de flexibilité en ce point peut permettre à ce loop différentes positions susceptibles d'interagir avec le « site catalytique » que l'on suppose à proximité.

La proline P64 se situe dans le loop 4-5, à l'opposé du site catalytique (de son monomère). Toutefois, si on considère le dimère ou le tétramère de la protéine, on constate que cette proline est à proximité du loop 7-8, en vis-à-vis du site actif du monomère adjacent (figure II.2.3).

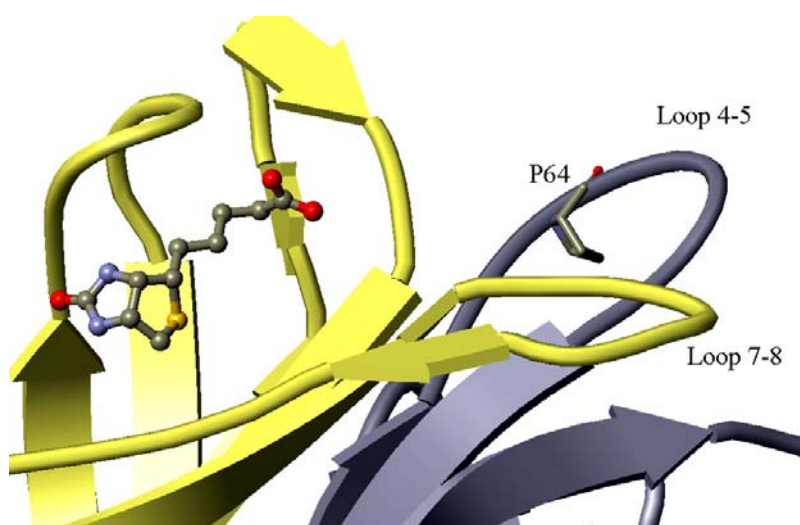
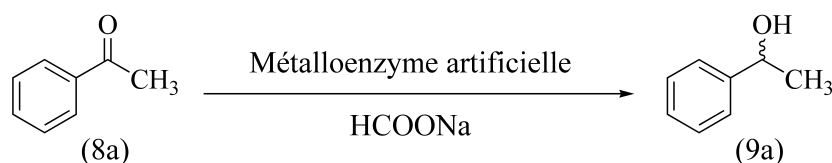


Figure II. 2.3 : Proximité du loop 4-5 du monomère B (bleu) et du loop 7-8 du monomère A (jaune). Possibilité d'un effet indirect de la proline 64 sur le site actif *via* l'intermédiaire du loop 7-8.

De plus la proline est un acide aminé cyclique qui impose des contraintes angulaires fortes (ψ restreint et Φ bloqué par le cycle). De part cette spécificité, la proline est souvent retrouvée dans les coudes β (β -turn) de manière à imposer un changement de direction dans la structure secondaire.^[99] Le remplacement de la proline P64 par une glycine qui offre de la flexibilité peut se répercuter sur le loop 7-8 qui est à proximité du site catalytique supposé.

Un mutant de l'avidine, le r-GA_{vi}, est également testé. Le point isoélectrique de l'avidine est élevé (pI = 10.4) par rapport à la streptavidine (pI = 6.4). A pH = 6.5, l'avidine est globalement chargée positivement alors que la streptavidine est proche de la neutralité. Ce test avec r-GA_{vi}, qui possède un pI plus bas (pI = 5.4), doit permettre de juger de

l'importance de la charge globale de la protéine sur la catalyse. Les résultats sont présentés dans le tableau II.2.2.



Entrée	Complexe	Protéine	Conv. (%)	Ee (%)
1	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav Wt	55	57 (R)
2	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Avi Wt	24	22 (R)
3	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	rGAvi	40	22 (R)
4	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav S112G	90	28 (R)
5	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav V47G	42	68 (R)
6	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav K80G	54	65 (R)
7	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav P64G	54	72 (R)
8	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav S112G-P64G	95	58 (R)
9	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav Wt	29	56 (S)
10	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Avi Wt	17	17 (R)
11	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	rGAvi	47	7 (R)
12	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav S112G	42	8 (S)
13	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav V47G	8	56 (S)
14	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav K80G	31	51 (S)
15	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav P64G	30	58 (S)
16	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i\textbf{p-L})\text{Cl}]$	Sav S112G-P64G	38	0

Les catalyses sont réalisées à 45° C durant 40 heures avec le mélange HCOONa (0.5 M) + B(OH)₃ (0.45 M) au pH_{initial} = 6.25. Le ratio HCOONa / S / C = 4200 / 100 / 1.

Tableau II. 2.2 : Tests catalytiques pour l'optimisation génétique.

Bien qu'il y ait une augmentation de la conversion avec la protéine recombinante avidine (rGAvi) comparativement à l'avidine (Avi Wt) (entrées 2 vs. 3 et 10 vs. 11), celle-ci demeure modeste et inférieure à celle observée avec la streptavidine (Sav Wt) (entrées 1

et 3). Dans le cas du $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$, la conversion s'avère supérieure à celle observée avec Sav Wt, mais la sélectivité est beaucoup moins bonne (entrées 9 et 11). Elle est même inférieure à celle observée avec Avi Wt (entrées 10 et 11). En définitive, le point isoélectrique (pI) ne semble pas jouer un rôle primordial sur la catalyse et confirme que la streptavidine est une meilleure protéine hôte que l'avidine.

La mutation S112G, la plus proche du site, semble favoriser la conversion, notamment dans le cas du complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (entrées 1 et 4) avec 90 % de conversion. Elle s'accompagne d'une diminution de la sélectivité avec 28 % ee en faveur de l'énantiomère (*R*). Cette observation s'applique également avec le $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (entrées 9 et 12). On peut supposer qu'une diminution de l'encombrement stérique, en passant d'une sérine à une glycine, de même qu'une flexibilité accrue du loop 7-8 à cette position, permettent une plus grande facilité d'accès du substrat au métal. En contrepartie cet espace moins restrictif s'accompagne d'une moindre sélectivité.

La mutation K80G apporte peu de variation tant sur la sélectivité que sur la conversion (entrées 1 vs. 6 et 9 vs. 14). La chaîne α de cette lysine étant tournée vers l'extérieur de la protéine (figure II.2.2), en interaction avec le milieu aqueux, il est raisonnable de penser que son remplacement par une glycine n'a pas modifié l'environnement direct du métal.

La mutation V47G ne présente pas un effet clairement bénéfique sur la catalyse, malgré une augmentation de 11 % de l'excès énantiomérique en faveur de l'énantiomère (*R*) avec le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (entrées 1 et 5). Cette hausse de sélectivité s'accompagne d'une baisse de la conversion que l'on observe plus nettement avec le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (entrées 9 et 13). Si cette mutation a modifié sensiblement le placement des complexes dans la poche de la protéine, cette stratégie de mutation (proche du site d'ancrage) apparaît risquée pour optimiser le système.

La mutation P64G est celle qui montre la plus grande influence sur la sélectivité. Avec le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (entrées 1 et 7) on observe une augmentation de 15 % en faveur de l'énantiomère (*R*) tout en conservant une conversion similaire en comparaison avec Sav Wt. Bien que P64G soit la mutation la plus distante par rapport au site actif dans un même monomère, il est plus vraisemblable de considérer le dimère et l'interaction du loop 4-5 qui porte la proline P64 avec le loop 7-8 du monomère

adjacent. De ce point de vue, P64G peut être considérée comme une mutation « proche », qui agit de manière indirecte sur le site actif *via* l'intermédiaire du loop 7-8.

Le double mutant S112G-P64G à un effet délétère marqué sur la sélectivité avec le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ qui produit le 1-phényléthanol (9a) en mélange racémique (entrées 9 et 16). Comparativement à Sav Wt, la conversion est améliorée quelque soit le complexe utilisé. On obtient 95 % de conversion et un excès énantiomérique de 58 % (*R*) avec le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (entrée 8). Considérant les mutants P64G, S112G et S112G-P64G, ce dernier présente des résultats différents de chacun des simples mutants et il est raisonnable de penser qu'il possède des propriétés qui lui sont propres, indépendamment des deux simples mutants. Néanmoins, si on considère que ce double mutant est porteur à la fois des « informations » de P64G et de S112G, l'effet cumulé de ces mutations sur la catalyse pourrait être additif, partiellement additif, synergique, antagoniste ou absent.^[172] En considérant les résultats sous cet angle, on remarque que la meilleure conversion est obtenue avec S112G (conv. = 90 % et ee = 28 % (*R*)) alors que P64G (conv. = 54 % et ee = 72 % (*R*)) donne la meilleure sélectivité avec une conversion équivalente à Sav Wt. Le double mutant donne une conversion de 95 %, légèrement supérieure à celle de S112G, avec une sélectivité de 58 % qui est 8 % supérieure à la valeur moyenne de 50% (*R*) (moyenne entre 28 % (*R*) et 72 % (*R*)). Bien qu'il ne soit pas permis à ce stade de conclure sur ce point, dans l'hypothèse d'un effet cumulé lors d'une double mutation, ces mutations apparaissent partiellement additives et coopératives sur la sélectivité, ce qui conforte l'idée d'une interaction du loop 4-5 qui porte P64 avec le loop 7-8 qui comporte S112 à sa base.

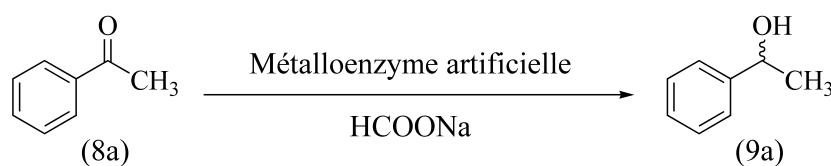
Cette première optimisation « chimio-génétique » nous a permis d'obtenir des premiers résultats très encourageants qui confirment le rôle de la seconde sphère de coordination dans le contrôle de la sélectivité. Un changement de protéine hôte, pour un même complexe, conduit à des écarts de plus de 50 % de l'excès énantiomérique en faveur de l'énantiomère (*R*) (entrées 2 et 7) ou en faveur de l'énantiomère (*S*) (entrées 15 et 16). Cette technologie peut allier l'optimisation génétique à une optimisation chimique, ce qui a permis d'obtenir les deux énantiomères avec une même protéine hôte, simplement en changeant le ligand arène du complexe biotinylé (entrées 7 et 15).

2.3. Optimisation des conditions réactionnelles et variation des substrats

Afin d'optimiser ces résultats, les conditions de réaction sont affinées en testant l'ajout d'un tampon complémentaire, différentes températures et l'addition de solvants organiques.

2.3.1. Température et dénaturation

Dans certains cas, le tampon mixte acide borique – formiate ne joue pas parfaitement son rôle et le pH en fin de catalyse se situe parfois au delà de $\text{pH}_{\text{final}} = 7.5$. Pour remédier au problème, différents tampons comme le MES, le MOPS ou le BisTris sont additionnés en complément. Lors de ces différents tests, le MOPS se révèle être le plus performant avec une concentration finale de 0.15 M (tableau II.2.3).



Entrée	Complexe	Protéine	T. (°C)	Conv.(%)	Ee (%)
1 ^{a, b}	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	Sav Wt	45	55	57 (R)
2 ^a	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	Sav Wt	45	40	66 (R)
3	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	Sav Wt	55	82	68 (R)
4	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	Sav Wt	65	76	66 (R)
5	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	Sav P64G	55	90	85 (R)
6	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	Sav P64G	65	88	82 (R)

Les catalyses sont réalisées en présence du mélange HCOONa (0.5 M) + B(OH)₃ (0.45 M) combiné avec du MOPS (0.15 M) au $\text{pH}_{\text{initial}} = 6.25$, durant 64 heures. Le ratio HCOONa / S / C = 4200 / 100 / 1. a) Durée de réaction de 40 heures. b) Catalyse réalisée sans MOPS

Tableau II. 2.3 : Effet du MOPS et de la température sur la catalyse.

Cet ajout de MOPS permet de maintenir le $\text{pH}_{\text{final}} \leq 7.0$ en moyenne. Cette stabilisation du pH s'accompagne d'une baisse de la conversion mais également d'une

hausse de la sélectivité (entrées 1 et 2). De manière à contrebalancer cette diminution de la conversion, la température ainsi que la durée de réaction sont augmentées. Une température de 55° C et un temps de réaction de 64 heures permettent d'obtenir une augmentation de la conversion tout en conservant la même énantiosélectivité (entrées 2 et 3). De manière surprenante, la conversion n'augmente pas à 65° C et on note une légère baisse de l'énantiosélectivité, que ce soit avec la protéine Sav Wt (entrées 3 et 4) ou Sav P64G (entrées 5 et 6). A cette température, on observe de nouveau la présence d'un précipité en fin de catalyse. Dans le but de vérifier la présence de protéine dénaturée, un gel électrophorèse (en conditions non dénaturantes) est réalisé sur les quatre échantillons 3 à 6. Ce gel montre une trace de monomère (dénaturation) uniquement pour les échantillons 4 et 6 réalisés à 65° C.

Il est possible que la baisse de conversion et de sélectivité, observée pour les catalyses à 65° C, soit due à une dénaturation partielle de la protéine au cours de la catalyse. Aux vues de ces différents résultats, les conditions de réactions optimales sont obtenues à 55° C pendant 64 heures en présence de MOPS (0.15 M).

2.3.2. Effet des solvants organiques sur la catalyse

Le complexe et les substrats sont préparés dans le DMF qui représente moins de 1.5 % du volume total de la catalyse. Il est intéressant d'évaluer l'effet d'une quantité plus importante de solvant, de même que l'importance de la nature du solvant organique utilisé (figure II.2.4).

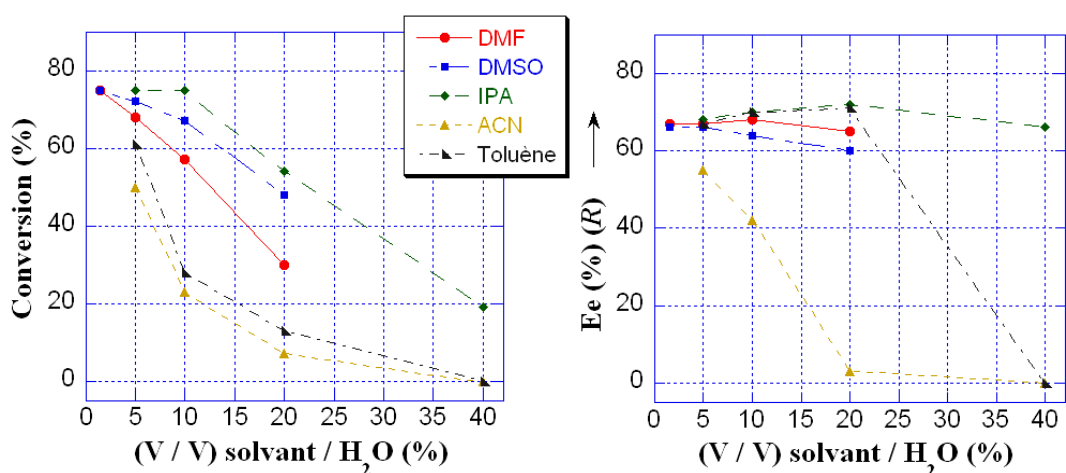


Figure II. 2.4 : Effet des solvants organiques sur la conversion et la sélectivité pour la réduction de l'acétophénone (8a) avec le catalyseur $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-p-L)Cl}] \subset \text{Sav Wt}$ à 55° C.

Ces tests sont réalisés avec l'acétophénone (8a) et l'enzyme artificielle $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-p-L)Cl}] \subset \text{Sav Wt}$ à 55° C. Plusieurs solvants de polarités différentes (IP : indice de polarité) sont ajoutés en différentes proportions (v / v) pour évaluer leur effet sur la catalyse. Le diméthylsulfoxyde (IP = 7.2) et le diméthylformamide (IP = 6.4) sont des solvants aprotiques fortement polaires et totalement miscibles à l'eau (IP = 9). De polarité légèrement inférieure, l'acétonitrile (IP = 5.8) est également aprotique et miscible avec l'eau. L'isopropanol (IP = 3.9), moyennement polaire, est protique et miscible à l'eau. Enfin le toluène (IP = 2.4) est un solvant aprotique peu polaire, non miscible à l'eau.

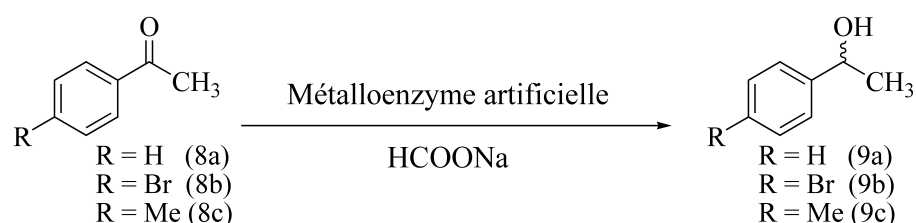
D'après les courbes de la figure II.2.4, les conversions chutent au-delà de 5 % de solvant organique excepté avec l'isopropanol, dont la conversion se maintient jusqu'à un ajout de 10 %. Avec le toluène et l'acétonitrile la décroissance est rapide et inhibe totalement le catalyseur avec 40 % de solvant organique. Concernant la sélectivité, l'acétonitrile est le solvant le plus préjudiciable et 20 % sont suffisants pour que le catalyseur produise du racémate. Avec les autres solvants testés, au delà de 10 % les valeurs commencent à diminuer, excepté pour l'isopropanol et le toluène dont la sélectivité se maintient, voir augmente légèrement (+ 5 % ee) jusqu'à 20% de solvant organique. Les résultats obtenus avec l'acétonitrile, tant sur l'activité catalytique que sur la sélectivité, laisse suggérer un mécanisme d'inhibition du catalyseur, peut-être dû aux propriétés

coordonnantes de ce solvant vis-à-vis du métal. Néanmoins, le DMSO et le DMF qui sont également des solvants coordonnants ne présentent pas le même profil de courbe, ce qui laisse penser que la solvation de l'eau sur ces trois solvants est différente. Concernant le toluène, seule l'activité catalytique est inhibée. Le substrat (l'acétophénone (8a)) est très peu soluble dans l'eau, et lors de cette réaction biphasique son coefficient de partage entre le toluène et l'eau est défavorable à la phase aqueuse. Ainsi, il est probable que l'augmentation du volume de toluène diminue progressivement l'accès du substrat au catalyseur jusqu'à la disparition complète de la conversion.

La présence de solvants organiques nuit aux catalyseurs hybrides. Le solvant qui apparaît être le moins pénalisant est l'isopropanol jusqu'à 10 %. Ce solvant donne des résultats équivalents à ceux du protocole précédemment établi qui emploie moins de 1.5 % de DMF (v / v). Aucune amélioration n'est donc obtenue par l'ajout de solvants organiques dans le milieu de catalyse.

2.3.3. Variation des substrats

Ayant optimisé les conditions réactionnelles du transfert hydrogénant grâce à l'augmentation de température et au rajout de tampon MOPS, deux autres substrats, le *p*-bromoacétophénone (8b) et le *p*-méthylacétophénone (8c) sont testés en plus de l'acétophénone (8a). Les substrats ((8b) et (8c)) qui possèdent un substituant en *para* sont plus encombrés que l'acétophénone. Le groupement méthyle du substrat (8c) désactive le carbonyle en le rendant moins électrophile, comparativement à l'acétophénone (8a). Inversement, le substrat bromé (8b) est plus activé que l'acétophénone. Ces substrats sont testés avec Sav Wt et deux mutants de la streptavidine. Les meilleurs résultats sont reportés dans le tableau II.2.4.



Entrée	Complexe	Cétone (S)	Protéine	Durée (h)	Conv. (%)	Ee (%)
1	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8a	Sav Wt	64	82	68 (<i>R</i>)
2	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8a	P64G	64	90	85 (<i>R</i>)
3	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	P64G	64	97	89 (<i>R</i>)
4	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8c	P64G	64	92	94 (<i>R</i>)
5	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8a	S112G-P64G	40	100	67 (<i>R</i>)
6	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	S112G-P64G	40	100	88 (<i>R</i>)
7	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8c	S112G-P64G	40	100	90 (<i>R</i>)
8	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8a	Sav Wt	64	37	48 (<i>S</i>)
9	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	Sav Wt	64	90	46 (<i>S</i>)
10 ^a	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8c	P64G	64	34	57 (<i>S</i>)
11	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8c	P64G	64	44	44 (<i>S</i>)

Les catalyses sont réalisées à 55° C avec le mélange HCOONa (0.5 M) + B(OH)₃ (0.45 M) combiné avec MOPS (0.15 M) à pH_{initial} = 6.25. Le ratio HCOONa / S / C = 4200 / 100 / 1. a) Catalyse réalisée à 45° C.

Tableau II. 2.4 : Variation des substrats et optimisation des meilleurs résultats.

Avec le mutant P64G, on obtient de très bons excès énantiomériques, jusqu'à 94 % (*R*) et 92 % de conversion avec le substrat (8c) (entrée 4). Concernant l'effet du substituant du substrat sur la conversion, le plus activé (8b) donne effectivement une conversion supérieure à l'acétophénone (entrées 2 vs. 3 et 8 vs. 9). Le substrat (8c), le plus désactivé ne présente pas de baisse de la conversion comparativement à l'acétophénone (entrées 2 et 4). Les deux substrats (8b) et (8c), plus encombrés que l'acétophénone ont tendance à donner de meilleures sélectivités (entrées 2 à 4 et 5 à 7).

Le double mutant S112G-P64G donne des conversions quantitatives avec chacun des substrats en seulement 40 heures avec de bons excès énantiomériques, notamment avec les substrats (8b) et (8c) qui donnent respectivement 88 % (*R*) et 90 % (*R*).

La tendance du complexe portant le benzène (comme ligand arène) à fournir l'énantiomère inverse, par rapport au complexe portant le *p*-cymène (ligand arène), est confirmée avec ces trois substrats. On notera que l'augmentation de température à 55° C se traduit par une baisse de la sélectivité pour le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (entrées 10 et 11).

2.4. Méthode de suivie de la conversion par RMN ^{19}F

Dans la première partie de cette étude, il est souvent question d'optimiser les conditions réactionnelles des enzymes artificielles. Parfois, cela ne requiert que la mesure de la conversion. Dans ce contexte, une méthode rapide et simple permettant de quantifier la conversion en présence de protéine, sans nécessiter ni traitement ni extraction du brut de catalyse, devient intéressante.

L'élément fluor étant absent des protéines, une analyse RMN du noyau ^{19}F peut être directement effectuée sur le brut de réaction. L'intérêt de cette analyse est qu'elle ne nécessite aucun traitement, s'accommode de la présence de la protéine, de la source d'hydrures ou encore de l'eau dans le système. Ainsi, un substrat possédant un atome de fluor peut servir de sonde pour déterminer la conversion d'une catalyse. Pour cela, il est nécessaire que l'environnement chimique de cet atome soit suffisamment différent entre le substrat et le produit de manière à observer un déplacement chimique en RMN ^{19}F .

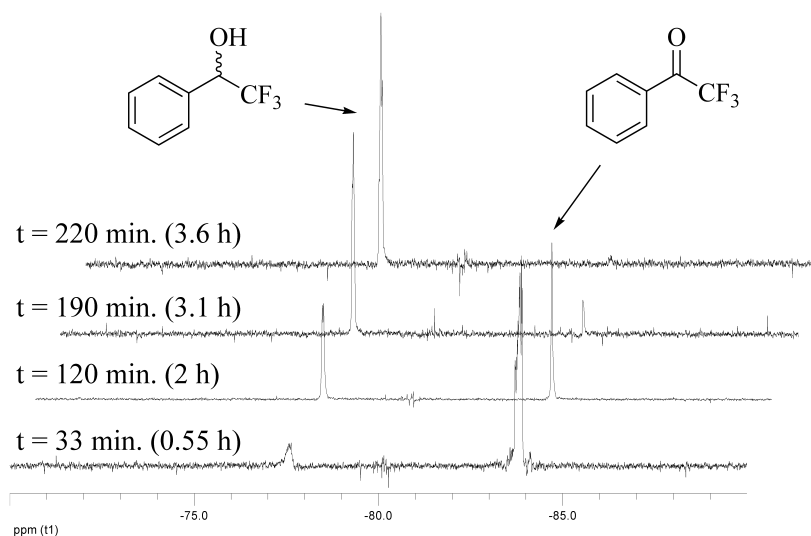
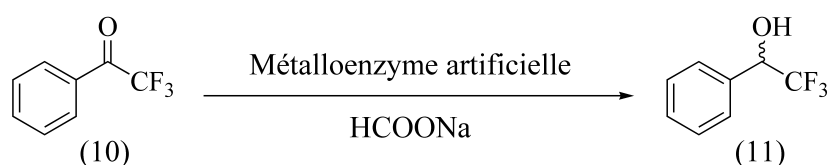


Figure II. 2.5 : Suivi de la conversion par RMN ^{19}F pour la réduction du substrat (10) par le catalyseur $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}] \subset \text{P64G}$ à 55°C .

Afin de valider la technique, cette méthode est appliquée pour déterminer le TOF du catalyseur $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}] \subset \text{P64G}$ pour la réduction du 2,2,2-trifluoroacétophénone (10) (figure II.2.5 et tableau II.2.5). Différents ratio S / C sont testés afin d'évaluer l'efficacité de ce catalyseur avec une concentration croissante de substrat (non miscible à l'eau).



Entrée	Durée (h.)	Conv. (%)	Ratio S / C	TOF (h ⁻¹)
1	0.55	10	100	18
2	2	52	100	26
3	3.1	90	100	28
4	3.6	99.5	100	27
5	64	100	200	-
6	64	100	500	-
7	64	84.5	1000	13

Les catalyses sont réalisées à 55° C avec le catalyseur $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{P64G}$ pour la réduction du 2,2,2-trifluoroacétophénone (10) avec le mélange HCOONa (0.5 M) / B(OH)_3 (0.45 M) + MOPS (0.15 M). Conversions déterminées par RMN ¹⁹F.

Tableau II. 2.5 : Conversions et TOF déterminés par RMN ¹⁹F pour le transfert hydrogénant du 2,2,2-trifluoroacétophénone (10) par les métalloenzymes artificielles.

Bien que ce substrat soit très réactif, le transfert hydrogénant procède assez lentement avec un TOF d'environ 25 h⁻¹ pour le catalyseur hybride $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{P64G}$ (entrées 1 à 4). Les entrées 5 à 7 permettent d'évaluer la conversion pour des ratio S / C croissants. La conversion étant totale pour les entrées 5 et 6, le TOF ne peut être calculé. A noter qu'il est possible de réduire ce substrat avec un ratio élevé S / C = 1000, tout en conservant une conversion acceptable de 84 % (entrée 7). Dans ce cas, le TOF est inférieur (TOF = 13), probablement dû à une quantité insuffisante de source d'hydrures ($\text{HCOONa} / \text{S} = 8$ dans ce cas). Le TOF à 30 min (entrée 1) est inférieur à celui calculé pour les entrées 2 à 4. Cela suggère une période d'induction en début de catalyse, probablement nécessaire à la formation du complexe hydruure à partir du complexe chlorure précurseur $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$.

2.5. Origine de la sélectivité

En considérant les résultats obtenus en catalyse, il est clair que la sélectivité provient de l'environnement chiral fourni par la protéine, car en l'absence de celle-ci, le 1-phényléthanol (9a) est produit en mélange racémique (quelque soit le complexe et malgré la chiralité de la biotine). L'inversion d'énantiosélectivité observée lors de la substitution du ligand arène souligne également l'importance du complexe organométallique dans les mécanismes qui régissent la sélectivité.

Pour les complexes de type amino-sulfonamide, le mécanisme est décrit sans coordination du substrat sur le métal (*via* un état de transition à six centres, concerté) avec assistance du ligand.^[47, 49, 65] Avec le ligand TsDPEN, la sélectivité résulte de la configuration du métal et de l'interaction CH- π ^[65, 68] entre le groupement aryle du substrat et les protons du ligand arène du complexe (figure II.2.7), qui permet la différenciation des faces prochirales du substrat (figure II.2.6).

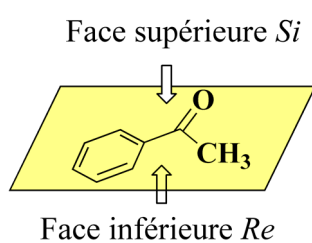


Figure II. 2.6 : Nomenclature des faces prochirales d'une cétone.

La configuration du métal est imposée par le ligand. Dans le cas du (*R, R*)-TsDPEN le métal est (*S*), et dans le cas du (*S, S*) le métal est (*R*).

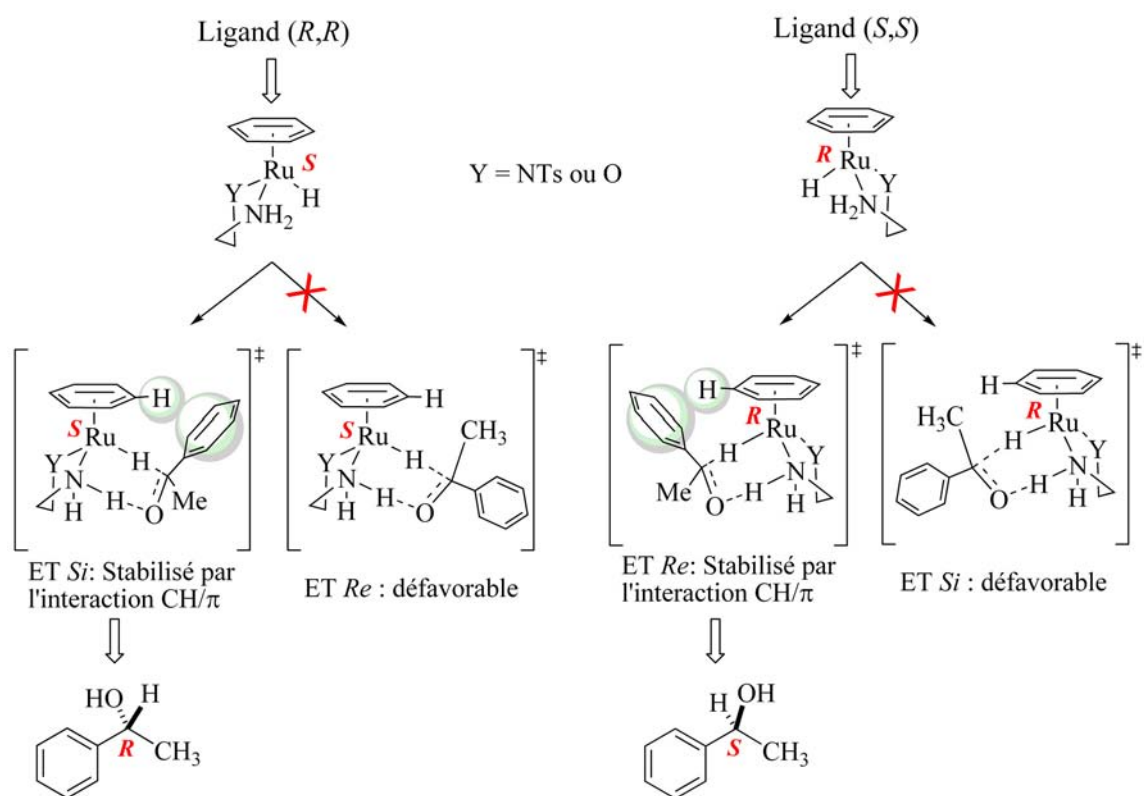


Figure II. 2.7 : Origine de la sélectivité pour le transfert hydrogénant avec des ligands de type amino-sulfonamide ou amino-alcool. Les groupements phényle du ligand TsDPEN ne sont pas représentés afin de simplifier le schéma.

2.5.1. Hypothèse sur les mécanismes énantiosélectifs

Dans le cas du ligand biotinylé **Biot-*p*-LH** (5), le chélate amino-sulfonamide est achiral et n'impose pas la configuration (R) ou (S) au métal. Lors de la synthèse du complexe $[\eta^6\text{-(arène)Ru}(\text{Biot-*p*-L})\text{Cl}]$ les deux configurations sont formées en mélange racémique. L'absence de signal en dichroïsme circulaire (CD) (entre 230 et 600 nm) et les résultats de catalyse obtenus en l'absence de protéine suggèrent qu'il s'agit d'un complexe en mélange racémique. En tenant compte du mécanisme décrit pour les complexes de type amino-sulfonamide ainsi que des résultats obtenus lors des tests catalytiques, une hypothèse vraisemblable sur l'origine de l'énantiosélectivité des métalloenzymes artificielles peut se présenter comme la combinaison de deux mécanismes énantiodiscriminants (figure II.2.8).

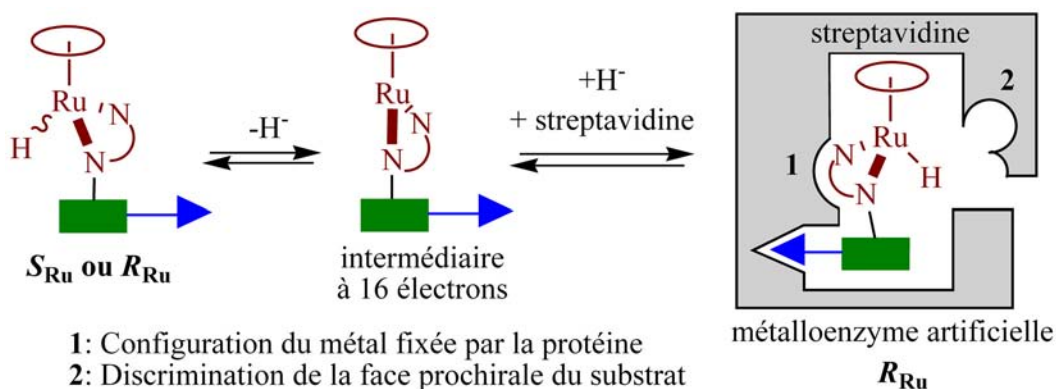


Figure II. 2.8 : Hypothèse sur l'origine de la sélectivité des métalloenzymes artificielles.

1 : Considérant la structure du complexe et de la protéine, il est possible que l'environnement stérique et électronique imposé par la protéine hôte privilégie une configuration donnée sur le métal (R_{Ru} ou S_{Ru}), une fois le complexe fixé dans la protéine.

C'est le complexe chlorure précurseur $[\eta^6\text{-(arène)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ qui est ajouté à la protéine, mais dès le premier cycle de catalyse, il y a formation du complexe $[\eta^6\text{-(arène)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})]$ à 16 électrons. Ce complexe intermédiaire, qui est indispensable à la régénération du complexe hydruure $[\eta^6\text{-(arène)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{H}]$, permet de racémiser ou de privilégier une configuration précise du complexe hydruure dès lors qu'une contrainte stérique suffisante s'exerce. Selon ce principe, les complexes avec les ligands arènes *p*-cymène et benzène peuvent adopter une configuration opposée dans la protéine.

2 : Une fois la configuration du métal fixée, le substrat peut tout de même se présenter par la face *Si* ou *Re* afin de déterminer la configuration du produit formé. De ce point de vue, il est raisonnable de penser que la discrimination résulte d'une combinaison d'interactions complexe – substrat (interaction CH- π) et protéine – substrat qui favorisent l'approche de la cétone par une face plutôt que l'autre.

2.5.2. Détermination de la configuration du métal dans la protéine.

Une méthode simple pour montrer qu'une des configurations du métal est privilégiée quand le complexe est fixé dans la protéine, est d'observer l'apparition d'un

signal en dichroïsme circulaire (CD) correspondant à un enrichissement de la chiralité sur le métal. Dans ce but, on ajoute successivement du complexe racémique $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ à une solution de protéine Sav P64G, en présence de formiate à 45°C de manière à former le complexe hydrure et permettre ainsi une réorganisation de la configuration. Ce couple complexe – protéine est choisi car il donne la meilleure sélectivité ce qui laisse penser que l'enrichissement dans une des configurations pourrait être plus important.

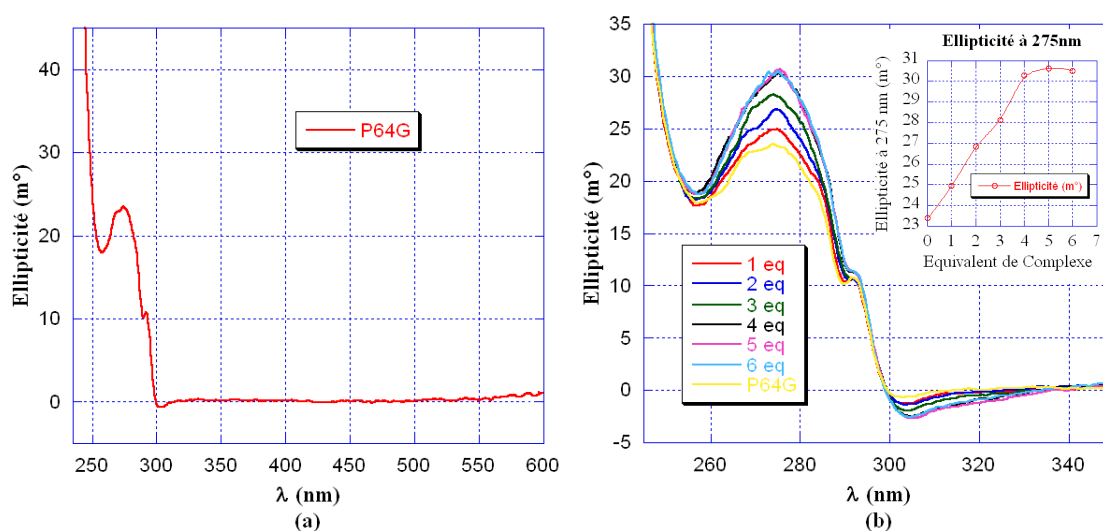


Figure II. 2.9 : Spectre CD : a) Protéine seule (mesuré de 235 à 600 nm). b) Ajouts successifs de complexe (nombre d'équivalents de complexe / sites actifs) (mesuré de 245 à 350 nm).

Le spectre CD de la protéine seule montre une bande d'absorption, due aux résidus tryptophanes, jusqu'à 300 nm (figure II.2.9 a)). La protéine possédant quatre sites capables de fixer la biotine, un équivalent de complexe biotinylé est ajouté successivement entre chaque mesure CD. Malheureusement, l'ajout de complexe ne conduit pas à l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption permettant une interprétation fiable du spectre. Toutefois, on observe bien une augmentation faible du signal à 275 nm, sous la bande de la protéine (figure II.2.9 b)). Ce signal augmente jusqu'au quatrième équivalent de complexe (par rapport aux quatre sites actifs). Au-delà du quatrième équivalent le signal n'augmente plus, les sites de la protéine étant saturés, le complexe ajouté en excès (non fixé dans la protéine) est en mélange racémique et ne donne aucun signal CD. L'augmentation du signal à 275 nm (absorption maximum) en fonction du nombre d'équivalent de complexe

est présentée dans l'encart de la figure II.2.9 b)). Bien qu'une interprétation fiable soit difficile, cette expérience semble confirmer l'hypothèse faite sur une configuration du métal induite par la protéine.

La même expérience réalisée avec le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru}(\mathbf{Biot-p-L})\text{Cl}]$ n'est pas aussi probante. Il y a bien une augmentation du signal sous la bande de la protéine, mais l'écart entre chaque signal est faible et continue de croître jusqu'au septième équivalent de complexe par rapport au quatre sites actifs (figure montrée dans l'annexe 1). Par conséquent il est difficile d'apporter trop de crédits à la première expérience réalisée avec le complexe $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru}(\mathbf{Biot-p-L})\text{Cl}]$.

En définitive, on ne peut en aucun cas acquérir de certitudes quand aux mécanismes à l'origine de la sélectivité, concernant l'habilité de la protéine à favoriser une configuration sur le métal.

Le spectres UV – visible des complexes $[\eta^6\text{-(benzène)Ru}(\mathbf{Biot-p-L})\text{Cl}]$ et $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru}(\mathbf{Biot-p-L})\text{Cl}]$ sont présentés dans l'annexe 1.

3. Vers une approche rationnelle du site actif

Pour mieux définir le site actif de ces catalyseurs hybrides et ainsi mieux renseigner les interactions responsables de la sélectivité, une autre approche consiste à évaluer l'effet sur la catalyse de différentes modifications ou mutations du système catalytique. L'apport d'un maximum de variations, tant au niveau des complexes que des substrats, ou encore de la protéine doit permettre d'acquérir des informations sur le site actif des alcools déshydrogénases artificielles. Une telle approche a pour but d'améliorer l'efficacité de ces catalyseurs et de rationaliser les interactions impliquées dans les mécanismes de discrimination.

3.1. Stratégie et localisation du site actif

Dans le mécanisme du transfert hydrogénant, le substrat n'est pas directement lié au métal. Il est notoire que ce type d'interactions, non covalentes, se retrouve fréquemment en catalyse enzymatique pour la stabilisation de l'état de transition ou encore le rapprochement des substrats. De ce point de vue, les interactions de seconde sphère de coordination de la protéine hôte sur le complexe biotinylé et le substrat représentent un moyen attractif d'optimisation de ces catalyseurs hybrides. Le criblage de 19 mutants de la streptavidine avec 21 complexes biotinylés, combinés à différents substrats, est entrepris.

3.1.1. Visualisation du site actif par le « docking »

Concernant la catalyse enzymatique et les techniques de mutagenèse associées à l'optimisation de ces procédés, il a récemment été rapporté que les mutations distantes du site actif améliorent souvent la stabilité ou la solubilité des enzymes tandis que l'optimisation de la sélectivité résulte de mutations proches du site actif.^[173] Dans cet esprit, il est indispensable de pouvoir localiser le site catalytique des métalloenzymes artificielles. En d'autres termes, cela revient à déterminer suffisamment précisément la position du métal dans la protéine, afin de pouvoir varier son environnement direct.

En l'absence d'une réelle connaissance du site actif (structure aux rayons X de la protéine contenant un complexe biotinylé), l'utilisation du « docking » apparaît comme une alternative très intéressante. Le principe consiste à simuler les possibilités d'ancrage d'une petite molécule dans une macromolécule. Lors du processus de minimisation énergétique, seules certaines liaisons du complexe biotinylé sont optimisées tandis que la streptavidine (la macromolécule) est maintenue rigide (sans degré de liberté).^[174, 175] Cette étude est donc strictement qualitative. Toutefois, la position de la biotine dans la protéine étant parfaitement définie, grâce à la structure cristallographique de la biotine $\subset$ streptavidine, il est facile d'exclure les résultats non significatifs.

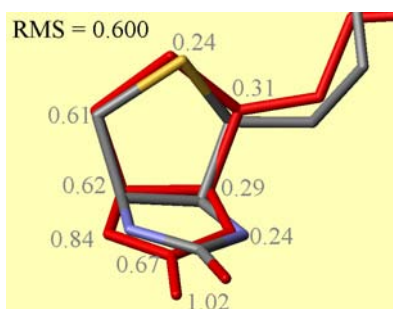


Figure II. 3.1 : Superposition des bicycles de la position réelle de la biotine (en rouge) avec celle du complexe biotinylé simulé (en gris). La valeur rms = 0.600 Å. Les distances (en Å) entre les atomes correspondants sont indiquées en gris.

En superposant le squelette bicyclique du complexe biotinylé « docké » avec celui de la biotine, on peut calculer l'écart type pour chaque coordonnée (x, y, z) d'un atome du bicycle et évaluer l'erreur type notée rms. Cette valeur de rms permet d'estimer la qualité de la simulation de docking (figure II.3.1). Par la suite, seules les simulations dont la valeur du rms est inférieure à 1 Å sont retenues et étudiées plus avant.

Les premières simulations sont réalisées avec $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}] \subset \text{Sav Wt}$ et permettent de visualiser un site catalytique probable et son environnement. Une représentation avec les surfaces permet de se représenter l'espace disponible pour l'approche du substrat (figure II.3.2).

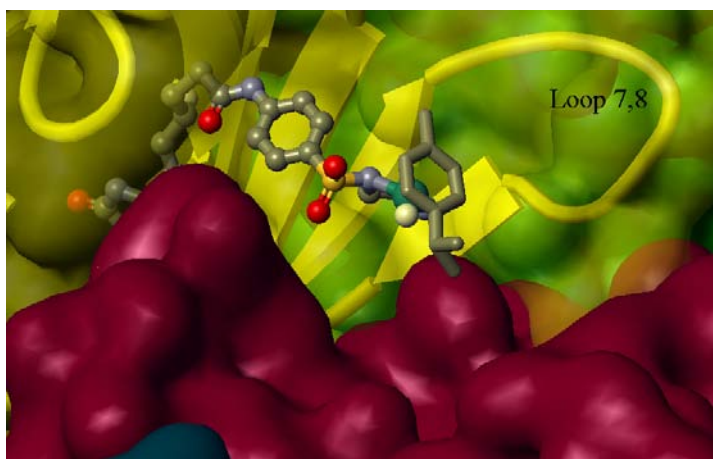


Figure II. 3.2 : Visualisation du site actif. Le monomère A (jaune) contient le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)H}]$. Le monomère C (violet), en vis-à-vis du monomère A, ainsi que les monomères B (vert) et D (bleu) sont partiellement représentés.

Dans les expériences réalisées, le complexe sort assez nettement de la poche hydrophobe ce qui rend le métal suffisamment accessible pour interagir avec le substrat. Dans la figure II.3.2 le ligand arène agit comme un chapeau qui couvre la poche et oblige le substrat à se glisser entre l'arène et la protéine. On remarque que le loop 7-8 se trouve à proximité du site catalytique supposé.

Pour la minimisation énergétique, certaines liaisons du complexe sont figées. La liaison amide doit garder une configuration Z et l'angle τ est fixé à $\tau = 0^\circ$ ou 180° . La configuration au métal est fixée soit (R), soit (S). Les liaisons signalées en vert sont optimisées (figure II.3.3). Pour chacun des complexes, il y a 4 isomères différents à considérer lors des simulations de docking.

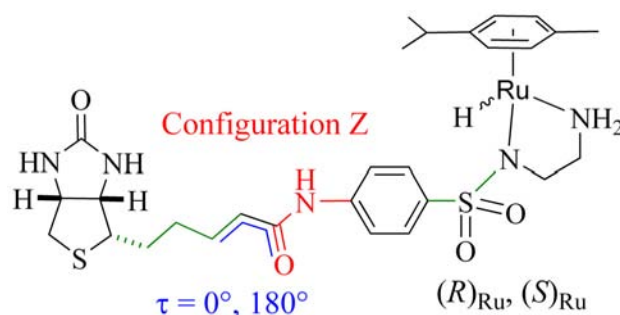


Figure II. 3.3 : Paramètres variables utilisés pour le docking du complexe $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-p-L)Cl}]$.

Pour calculer au mieux les distances entre le complexe et les acides aminés qui l'entourent, il est indispensable de se baser sur un nombre suffisant de simulations pour évaluer quels acides aminés se trouvent proche du métal. Pour cette approche statistique, les 4 isomères des complexes $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-p-L)H}]$ et $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-p-L)H}]$ sont préparés (sur Hyperchem 7.5) à partir des structures cristallographiques du complexe $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(TsDPEN)Cl}]$.^[176] Cinquante simulations sont réalisées pour chacun des 4 isomères, soit 200 simulations au total pour chacun des complexes. Les simulations et le calcul des distances ont été réalisés avec le logiciel AutoDock 3.0.5 par le Dr. S. Mazurek.

Sur les 200 résultats obtenus pour le complexe $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-p-L)H}]$, 135 sont retenus ($\text{rms} < 1 \text{ \AA}$). Les distances entre le carbone C_α (de chacun des acides aminés

du monomère A) et le ruthénium sont calculées et la valeur moyenne reportée sur la figure II.3.4 a).

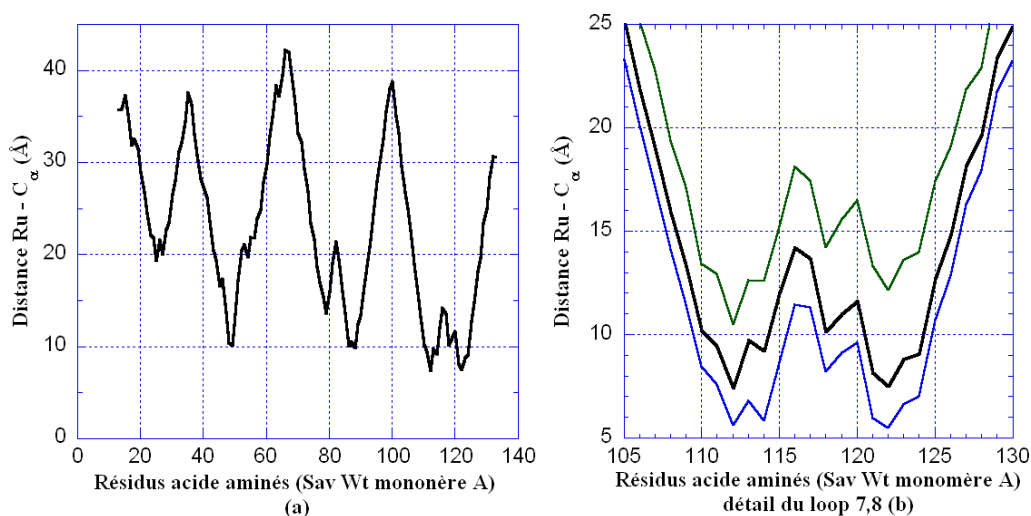


Figure II. 3.4 : a) Distance moyenne C_{α} – Ru pour le monomère A avec le catalyseur $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)H}] \subset \text{Sav Wt}$. b) Agrandissement du loop 7-8 (résidus les plus proches), indiquant la distance moyenne (noir), minimale (bleu) et maximale (vert).

Le loop 7-8 est poche du métal (figure II.3.4 a)) et il est intéressant de constater que les nombreuses simulations donnent des courbes de distances (valeur haute, moyenne et basse) qui ont la même allure, ce qui nous conforte dans l'idée d'une interprétation fiable des simulations (figure II.3.4 b)).

Les deux résidus les plus proches ont leur C_{α} entre 7 et 8 Å du ruthénium (S112, S122). Les distances de S112 et S122 par rapport au métal sont respectivement de 7.41 Å et 7.51 Å. En observant la structure de la protéine, on remarque que la sérine S122 pointe vers l'extérieur du site catalytique (figure II.3.5 a)). Dès lors, si l'on considère la distance O – Ru pour ces deux résidus, S112 est à 5.61 Å contre 9.15 Å pour le résidu S122.

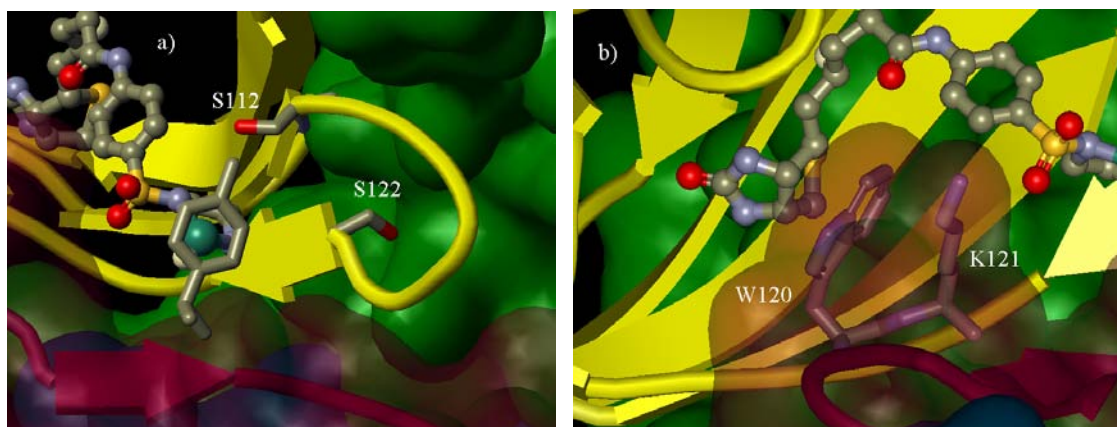


Figure II. 3.5 : a) Orientation des résidus S112 et S122 par rapport au complexe $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-p-L)H}]$ (monomère A en jaune). b) Interaction hydrophobe et stabilisation du résidu biotinylé par le tryptophane W120 du monomère adjacent (monomère C en violet).

En effectuant la comparaison des distances moyennes $C_\alpha - \text{Ru}$ pour les autres monomères (B, C et D), un seul acide aminé, la lysine K121 du monomère C, est à une distance inférieure à 10 Å du métal. La lysine 121 est adjacente au tryptophane W120 qui contribue à l'ancrage de la biotine par une interaction hydrophobe (figure II.3.5 b)). Une modification de son environnement direct pourrait nuire à la stabilité du complexe biotine – streptavidine. Ces différentes comparaisons réalisées avec le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-p-L)H}]$ s'avèrent qualitativement similaires.

La position 112 se présente comme la plus proche et la plus susceptible d'interagir sur la catalyse. Afin de tirer un maximum d'informations, la sérine de cette position (S112) sera remplacée successivement par chacun des 19 autres acides aminés naturels, par une technique de mutagenèse par saturation.

3.1.2. La stratégie du criblage

Dans le but d'obtenir un maximum de diversité, l'optimisation génétique (20 isomorphes de la streptavidine) est menée conjointement à une optimisation chimique (21 complexes biotinylés). Si l'on combine cette variation chimio-génétique avec 8 dérivés carbonylés de structures différentes, cela fait $20 \times 21 \times 8 = 3360$ combinaisons à tester en

catalyse. Ce criblage étant considérable, il doit être réduit au minimum requis pour identifier les catalyseurs efficaces et permettre une meilleure compréhension du site catalytique.

Afin de diminuer le nombre d'expériences, le criblage est séquencé selon trois axes (figure II.3.6). Dans un premier temps, tous les complexes sont évalués avec deux protéines (Sav Wt et Sav P64G). Dans un deuxième temps, les meilleurs complexes sont testés avec les 20 protéines. Enfin, les couples les plus performants sont testés en catalyse avec les différents substrats. Tous les tests catalytiques de ce criblage ont été réalisés et analysés conjointement avec Mlle A. Pordea.

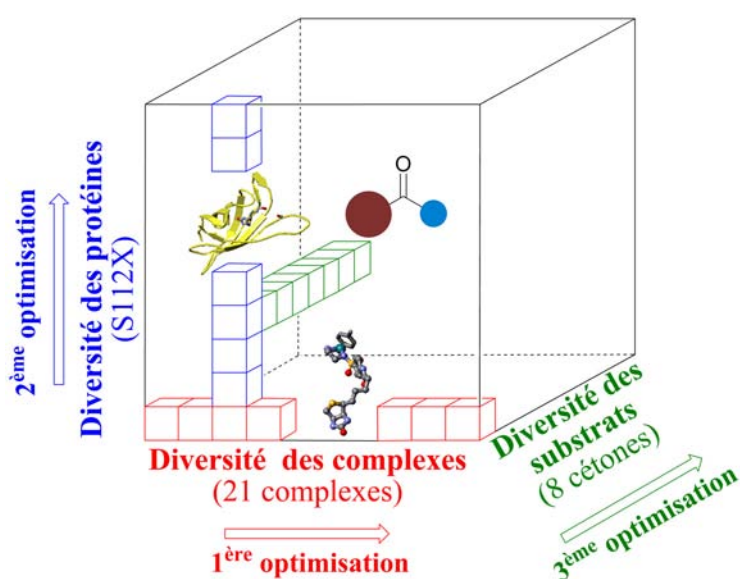


Figure II. 3.6 : Représentation de la stratégie de criblage (basée sur la référence ^[177]).

- La diversité génétique :

Les 19 mutants S112X de la streptavidine sont produits selon le protocole de mutagenèse qui emploie des codons dégénérés NNS à la position 112. Tous ces mutants sont produits par les biologistes au sein du groupe, essentiellement par le Dr N. Humbert.^[118]

- La diversité chimique :

La diversité chimique des complexes (6) est amenée par la combinaison de 3 ligands amino-sulfonamide (5) (*ortho*, *mé*ta et *para*) avec 5 différents arènes ruthénium (*p*-cymène, benzène, hexaméthylbenzène, durène, mésitylène). Deux autres métaux, le rhodium et l'iridium, sont également testés avec les trois ligands (**Biot-*q*-LH**) et l'arène pentaméthylcyclopentadiényle (C₅Me₅) (figure II.3.7).

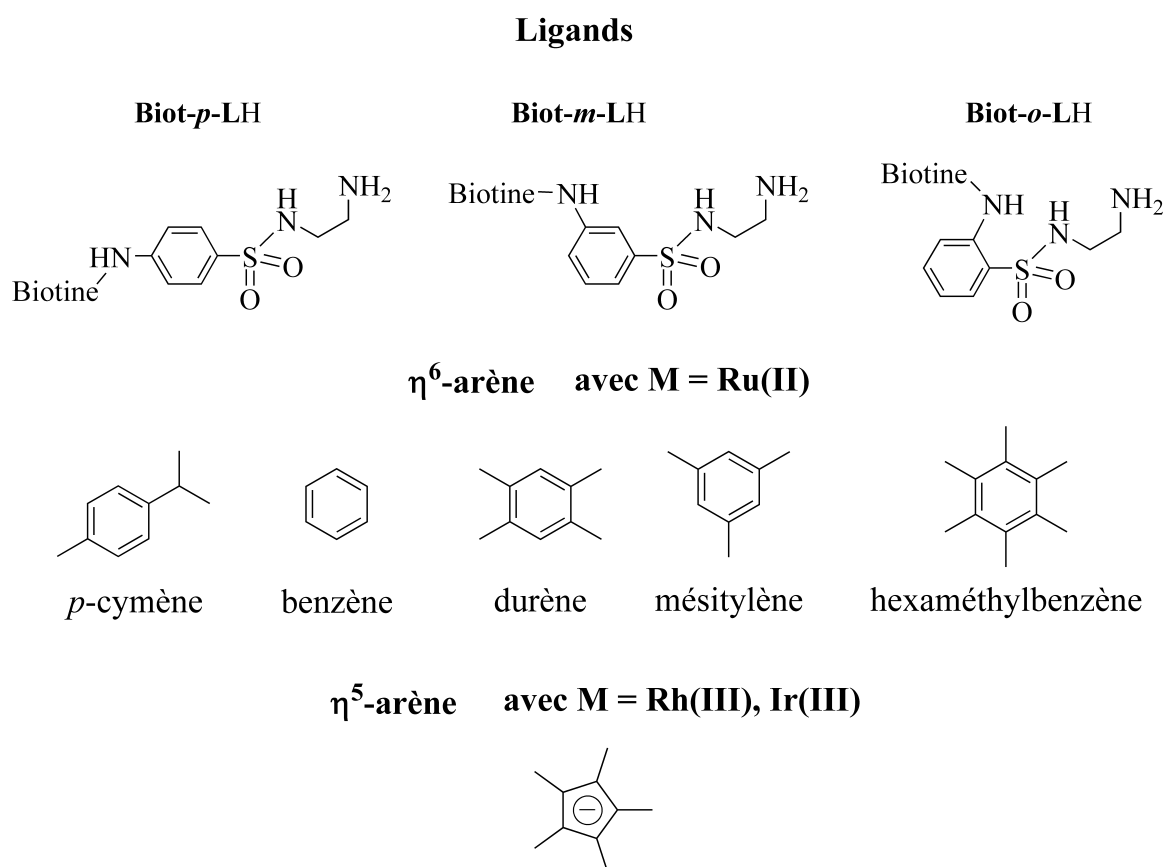


Figure II. 3.7 : Diversité et optimisation chimique.

Ayant précédemment constaté l'impact sur la sélectivité du changement du ligand arène (cf. tableau II.2.2), il est probable que ces différentes substitutions influent sur la catalyse. Les complexes à base d'iridium et de rhodium ont été décrits comme étant efficaces en transfert hydrogénant.^[60, 63] Il est donc intéressant de tester ces métaux avec les métalloenzymes artificielles.

- L'éventail de substrats :

En plus des trois dérivés de l'acétophénone (8a-c), cinq autres substrats sont testés. Trois dialkylcétones ((16), (18), (20)) avec des groupements alkyles de tailles différentes, une arylcétone cyclique (12) (stériquement plus contrainte) et une hétéroarylcétone (14) susceptible d'interagir comme accepteur de liaison hydrogène (figure II.3.8).

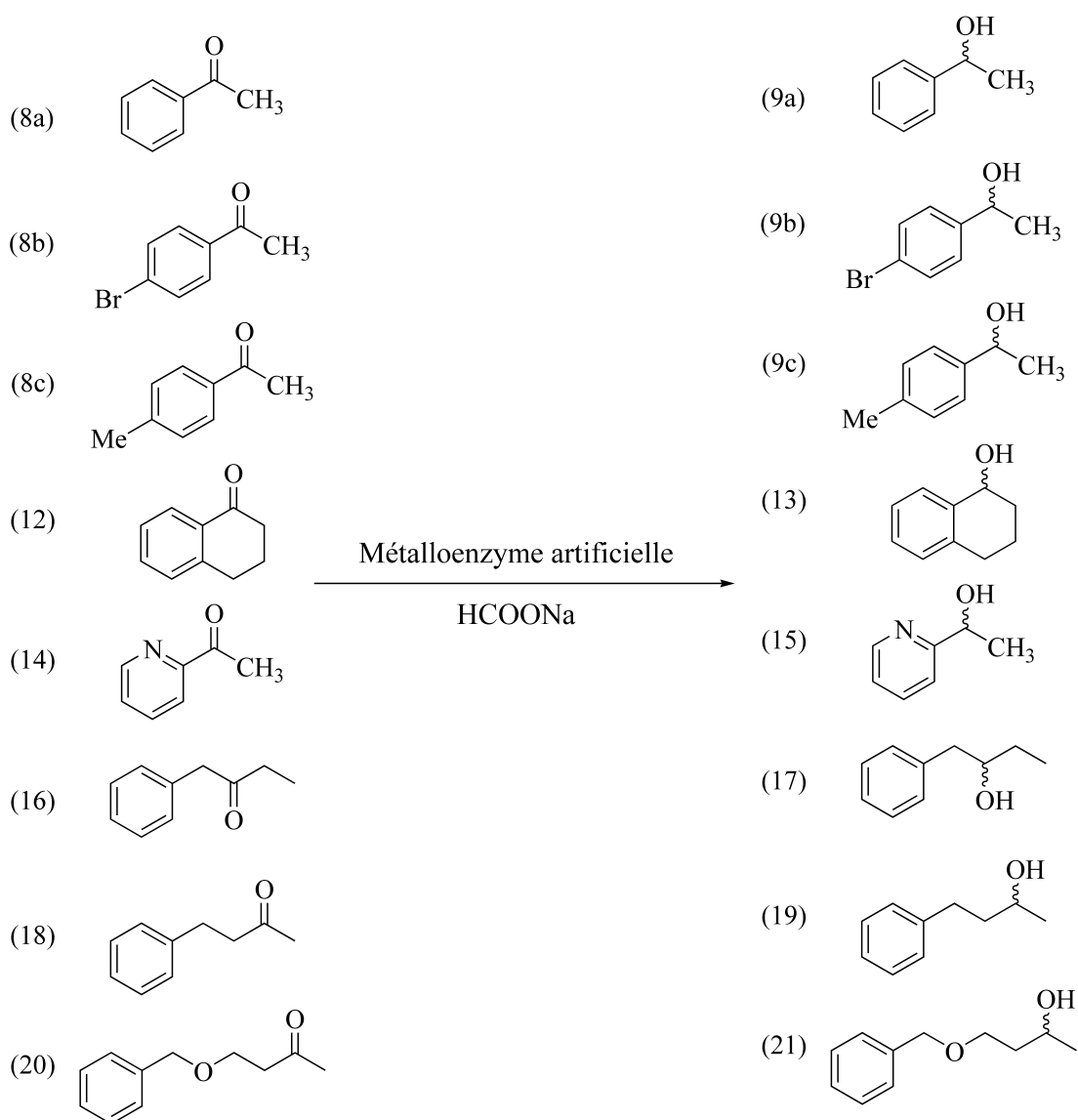


Figure II. 3.8 : Diversité des substrats.

3.2. Le criblage des complexes

Pour le criblage de la première dimension, il s'agit d'identifier les meilleurs complexes parmi les 21 candidats (figure II.3.7). Les critères de sélection sont basés sur l'efficacité (valeur de la conversion et de l'excès énantiomérique) ainsi que sur la diversité ((*R*) ou (*S*) sélectif) afin de ne pas restreindre le champ d'investigation pour le criblage des autres dimensions (protéine, substrats). Sav Wt et Sav P64G, qui a donné les meilleures sélectivités lors de la première optimisation chimio-génétique, sont sélectionnées pour tester ces complexes.

Pour simplifier la lecture des résultats, ceux-ci sont représentés à l'aide de carrés de couleurs, appelés également empreintes digitales.^[178] Chaque couleur correspond à une combinaison précise de la conversion et de la sélectivité. L'intensité de la couleur renseigne sur la conversion et la couleur varie du rose pour l'énantiomère (*S*) au vert pour l'énantiomère (*R*) en passant par le gris pour le racémat. Ce type de représentation est explicité par la figure II.3.9.

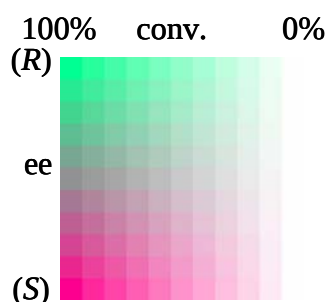


Figure II. 3.9 : Représentation de la conversion et de l'excès énantiomérique en mode « empreintes digitales ».

Les différents complexes $[\eta^n-(C_nR_n)M(\text{Biot-}q\text{-L})Cl]$ sont testés avec deux protéines hôtes (Sav Wt et Sav P64G) et un cocktail de 3 substrats, les dérivés de l'acétophénone (8a-c), de façon à observer une tendance générale (figure II.3.10).

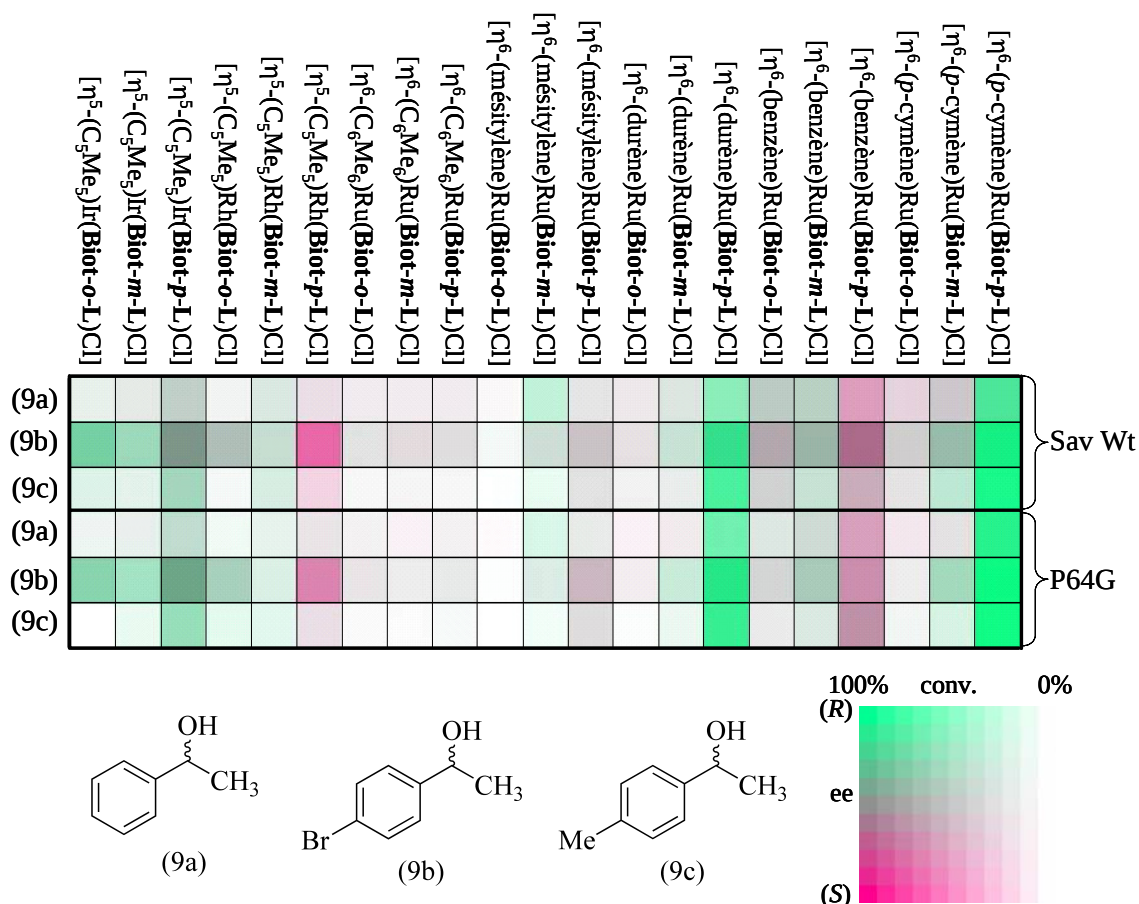


Figure II.3.10 : Criblage des complexes $[\eta^n-(C_nR_n)M(\text{Biot-}q\text{-L})\text{Cl}]$. Les tests catalytiques sont réalisés à 55° C pendant 40 heures en utilisant le mélange HCOONa (0.5 M) – acide borique (0.45 M) + MOPS (0.15 M) au $\text{pH}_{\text{initial}} = 6.25$. Le ratio HCOONa / S / C = 4000 / 33 / 1 (11 eq. de chaque substrat par rapport au métal).

L'utilisation de substrats en cocktail donne des résultats légèrement différents de ceux observés avec un substrat unique, mais ils restent tout à fait similaires et comparables. Avec ce premier criblage, on observe plusieurs tendances :

Que ce soit avec Sav Wt ou Sav P64G, les résultats sont similaires. D'un substrat à l'autre, les mêmes observations peuvent être formulées, même si avec le substrat *p*-bromoacétophénone (8b) les conversions sont souvent supérieures aux deux autres substrats (8a, 8c), notamment avec le complexe $[\eta^5-(C_5Me_5)Rh(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ (figure II.3.10).

En comparant colonne par colonne (figure II.3.10) on constate que certains complexes ont tendance à orienter la sélectivité en faveur d'un énantiomère ou de l'autre. Le complexe $[\eta^6\text{-(durène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ et le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ orientent vers l'énantiomère (*R*) (9a-c), tandis que le complexe $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5\text{)Rh(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ et le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ ont tendance à favoriser la formation de l'énantiomère (*S*).

Les complexes qui portent le ligand *para* (**Biot-*p*-LH**) sont plus actifs et sélectifs que les complexes comportant les ligands *ortho* ou *méta*, quelque soit le ligand arène, le substrat, le métal ou encore la protéine associés. Cela se remarque plus facilement avec les histogrammes de la figure II.3.11. Ils sont construits uniquement avec les résultats obtenus avec le *p*-bromoacétophénone (8b) et Sav Wt. On remarque que le ligand **Biot-*p*-LH** amène plus de diversité (figure II.3.11 b)) et des conversions supérieures (figure II.3.11 a)) aux deux autres ligands.

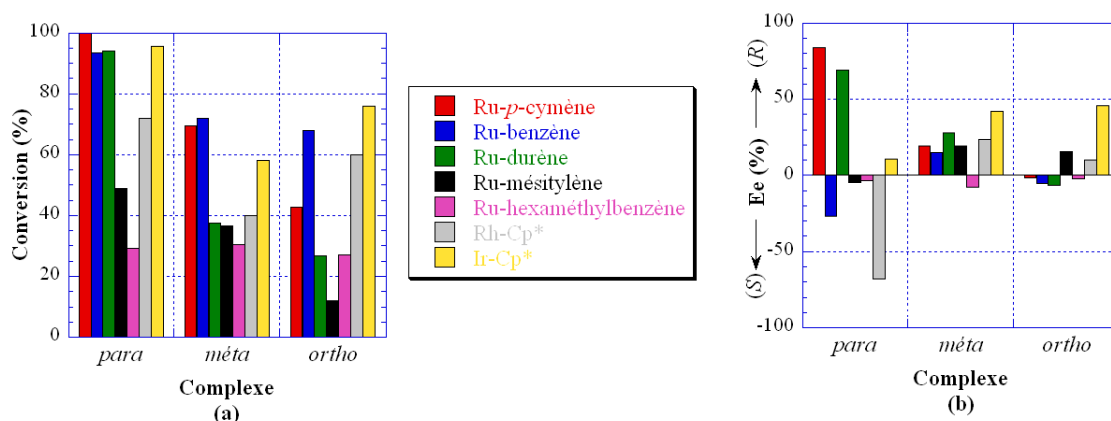


Figure II.3.11 : Evaluation des complexes et des ligands **Biot-*q*-LH**. Histogrammes construits avec les résultats obtenus pour Sav Wt et le substrat *p*-bromoacétophénone (8b). a) Conversion b) Enantiosélectivité.

Le type d'arène joue un rôle primordial tant pour l'activité catalytique que pour la sélectivité. Les ligands arènes fortement encombrés comme le mésitylène et l'hexaméthylbenzène donnent de mauvaises conversions (figure II.3.10), même avec le substrat le plus activé (8b) (figure II.3.11 a)). Avec à l'esprit les différentes représentations

obtenues par le docking, il est possible que les ligands arènes volumineux couvrent le site actif comme un chapeau et entravent l'accès du substrat au métal (cf. figure II.3.2 et II.3.5 a)).

Que ce soit en raison de la sélectivité, de la diversité ou de l'activité, cinq complexes se démarquent nettement et sont sélectionnés pour être testés avec toutes les protéines S112X. Le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ donne les meilleurs résultats que ce soit en terme de conversion ou de sélectivité avec une orientation (*R*). Le complexe $[\eta^6\text{-(durène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ est également l'un des plus actifs et des plus sélectifs (orientation (*R*)). Le complexe $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5\text{)Rh(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ et le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ orientent principalement en faveur du produit (*S*) avec des conversions plus modestes. Le complexe $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5\text{)Ir(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ donne de bonnes conversions et une sélectivité faible et peu orientée.

3.3. Le criblage des protéines

Vingt protéines S112X (Sav Wt et 19 mutants de la streptavidine) sont testées avec ces cinq complexes et le cocktail des trois dérivés de l'acétophénone (8a-c). Les résultats du criblage sont présentés sous forme d'empreintes digitales selon le même principe que précédemment (figure II.3.12).

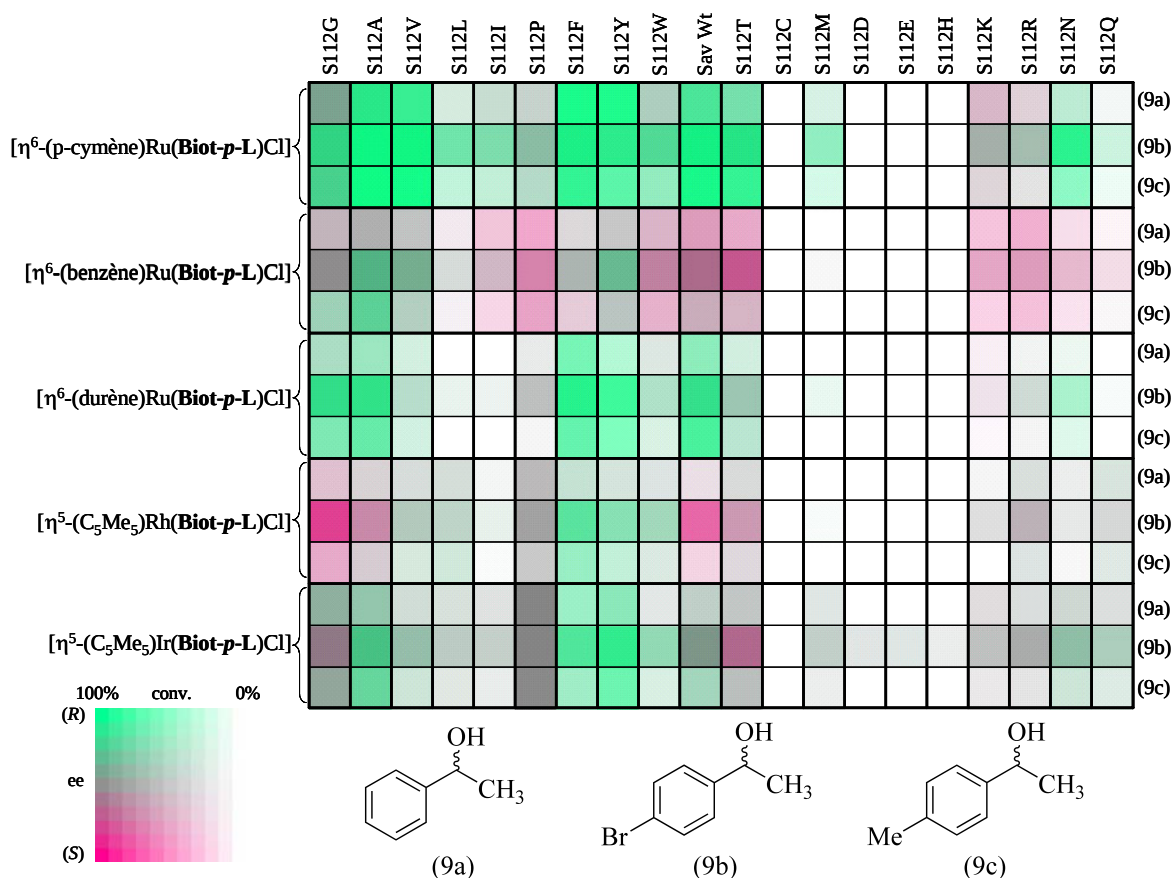


Figure II. 3.12 : Les tests catalytiques sont réalisés à 55° C pendant 40 heures en utilisant le mélange HCOONa (0.5 M) – acide borique (0.45 M) + MOPS (0.15 M) au pH_{initial} = 6.25. Le ratio HCOONa / S / C = 4000 / 33 / 1 (11 eq. de chaque substrat par rapport au métal).

Les acides aminés en position 112 qui possèdent sur leur chaîne latérale un groupement potentiellement coordonnant pour le métal inhibent l'activité catalytique (figure II.3.12). Ces groupements sont les carboxylates de l'acide aspartique (S112D) ou glutamique (S112E), le thiol de la cystéine (S112C) et de manière moins marquée le thioéther de la méthionine (S112M), ou encore l'histidine (S112H) qui est connue comme ligand avec certaines métalloenzymes naturelles. Il est probable que ces résidus se coordonnent au métal, occupant ainsi le seul site disponible pour la formation du complexe hydrure qui se trouve dès lors inhibé. Ces observations soutiennent clairement les expériences de « docking » qui localisent le métal à proximité de la position 112.

Lors du précédent criblage, on a constaté la capacité des complexes à favoriser un énantiomère avec les deux protéines Sav Wt ou P64G. Avec le criblage S112X, on retrouve cette tendance quelque soit le mutant testé (figure 3.12). Une forte proportion d’empreintes roses ((S)-sélectif) se retrouve avec les complexes $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5\text{)Rh(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ et $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$. On observe une majorité d’empreintes vertes ((R) sélectif) avec $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ et $[\eta^6\text{-(durène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ (figure II.3.12). De manière à confirmer et affiner ces observations plusieurs résultats sont reproduits, avec un substrat unique (pas de cocktail), à 1 % de catalyseur (tableau 3.1).

En examinant les résultats du tableau II.3.1, la tendance des complexes à orienter la sélectivité peut être nuancée si l’on considère le cas de certains mutants. Le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ est (R) sélectif avec S112Y (figure II.3.12) et S112A (entrée 7). Le complexe $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5\text{)Rh(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ est (R) sélectif avec S112Y (figure II.3.12) ou S112F (entrée 8). Les complexes $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ et $[\eta^6\text{-(durène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ qui sont (R) sélectifs (entrées 1 à 5) peuvent montrer une sélectivité inverse avec la protéine S112K et S112R (entrée 6 et figure II.3.12).

Afin de préciser ces observations, les résultats significatifs de la figure II.3.12 sont extraits et présentés sous forme d’histogramme (figures II.3.13 et II.3.14). Ces histogrammes décomptent le nombre de fois où l’on observe un excès énantiomérique par tranche de 20 % ee, en fonction de la protéine (figure II.3.13), pour les mutants S112K, S112R, S112A, S112F, S112Y ou en fonction du complexe (figure II.3.14).

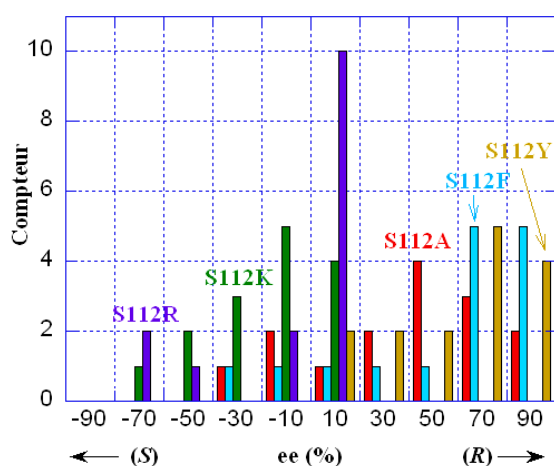


Figure II. 3.13 : Orientation de la sélectivité par les protéines S112X (S112K, S112R, S112A, S112F, S112Y).

D'après la figure II.3.13, la protéine hôte joue un rôle essentiel dans les processus de discrimination énantiosélectifs. Tous complexes et substrats confondus, les protéines S112Y, S112F et S112A ont tendance à privilégier la formation du produit (*R*), tandis que les protéines avec les résidus cationiques, S112K et S112R marquent nettement leur préférence en faveur de l'énantiomère (*S*). Avec le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ en passant de S112Y à S112K, ce seul point de mutation (S112X) permet une inversion de configuration avec un écart $\Delta E_e = 110 \%$ (entrées 3 et 6). Cela correspond à une différence d'énergie libre au niveau de l'état de transition de $\delta\Delta G^\ddagger < 1.99 \text{ kcal.mol}^{-1}$ à température ambiante.^[179]

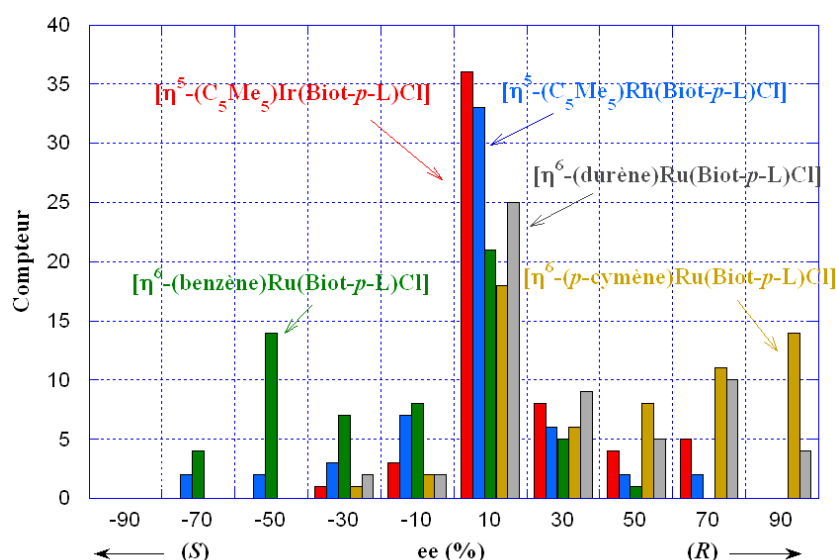
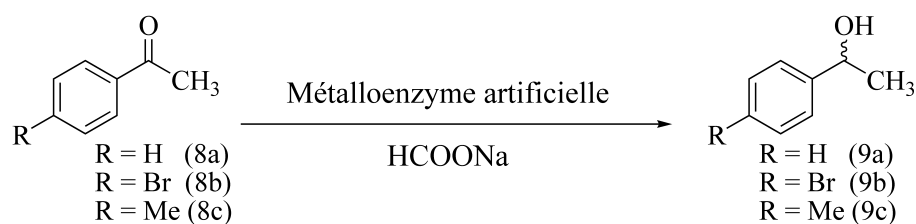


Figure II. 3.14 : Orientation de la sélectivité par les complexes $[\eta^n\text{-(C}_n\text{R}_n\text{)M(Biot-}p\text{-L)Cl}]$.

L'histogramme II.3.14 confirme le fort caractère inductif des complexes sur la sélectivité, quelque soit le substrat ou la protéine associés. Les complexes de ruthénium avec un ligand arène de type durène et *p*-cymène sont (*R*) sélectifs tandis que le complexe avec le benzène est (*S*) sélectif (figure II.3.14)). Le complexe de rhodium montre une faible tendance (*S*). Le complexe $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5\text{)Ir(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ ne montre aucune préférence (peu sélectif) (figure II.3.14)), ce qui le rend peut-être plus facilement orientable par la protéine (entrées 12 et 13 et figure II.3.12).



Entrée	Protéine	Complexe	Substrat	Conv. (%)	Ee (%)
1	S112A	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8c	98	91 (R)
2	Sav Wt	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8c	86	91 (R)
3	S112Y	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8a	95	90 (R)
4	S112Y	$[\eta^6\text{-(durène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	88	92 (R)
5	S112F	$[\eta^6\text{-(durène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	89	83 (R)
6	S112K	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8a	64	20 (S)
7	S112A	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8c	74	41 (R)
8	S112F	$[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5\text{)Rh(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	73	60 (R)
9	S112G	$[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5\text{)Rh(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	60	52 (S)
10	Sav Wt	$[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5\text{)Rh(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	48	52 (S)
11	S112T	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	90	55 (S)
12	S112T	$[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5\text{)Ir(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	95	16 (S)
13	S112Y	$[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5\text{)Ir(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	96	80 (R)
14	S112N	$[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-}i>p\text{-L)Cl}]$	8b	94	82 (R)

Les catalyses sont réalisées à 55° C durant 64 heures avec le mélange HCOONa (0.5 M) – acide borique (0.45 M) + MOPS (0.15 M) à pH = 6.25. Le ratio HCOONa / S / C = 4000 / 100 / 1. Tous les résultats sont reproduits au minimum deux fois.

Tableau II. 3.1 : Résultats sélectionnés pour le transfert hydrogénant de cétones avec le catalyseur $[\eta^n\text{-(C}_n\text{R}_n\text{)M(Biot-}i>p\text{-L)Cl}] \subset \text{S112X}$.

En définitive, la sélectivité est fortement conditionnée par le complexe utilisé (figure II.3.14), mais peut, dans certains cas, être contrebalancée par la protéine hôte, notamment quand celle-ci présente une tendance à orienter la sélectivité, comme c'est le cas pour les protéines S112A, S112F, S112Y, S112K, S112R (figure II.3.13).

En considérant l'accroissement stérique du groupement en C $_{\alpha}$ pour des acides aminés d'un même sous groupe (alkyle, acide, basique, aromatique, etc...) on constate une baisse de la conversion quand l'encombrement stérique augmente (figure II.3.12). Ainsi, S112A > S112I ~ S112L ; S112N > S112Q ; S112F ~ S112Y > S112W.

Ce criblage des mutants S112X avec les cinq meilleurs complexes, nous a permis d'identifier des enzymes artificielles performantes (couples complexe – protéine) pour le transfert hydrogénant avec les carbinols, dérivés de l'acétophénone (8a-c). On obtient plusieurs très bons excès énantiomériques, au-delà de 90 % (*R*), avec de bonnes conversions (entrées 1 à 4). Afin d'étendre le champ d'investigation, il est intéressant de tester ces catalyseurs hybrides avec d'autres substrats, notamment des dialkylcétones (non fonctionnalisées) souvent plus difficiles à réduire avec un bon degré de sélectivité. Cela permettra également de vérifier si les tendances observées se confirment avec des substrats différents.

3.4. Le criblage des substrats

Cinq substrats supplémentaires sont testés avec les deux complexes les plus représentatifs et 10 protéines S112X. Les complexes sélectionnés sont le [η^6 -(*p*-cymène)Ru(**Biot-*p*-L**)Cl] qui donne les meilleurs résultats (*R*) sélectifs et le [η^6 -(benzène)Ru(**Biot-*p*-L**)Cl] qui est le plus efficace des complexes (*S*) sélectifs. Le résultat de ce criblage est présenté sous forme d'empreintes digitales (figure II.3.15) et les résultats les plus intéressants sont reproduits avec un substrat unique (sans cocktail), à 1 % de catalyseur (tableau II.3.2).

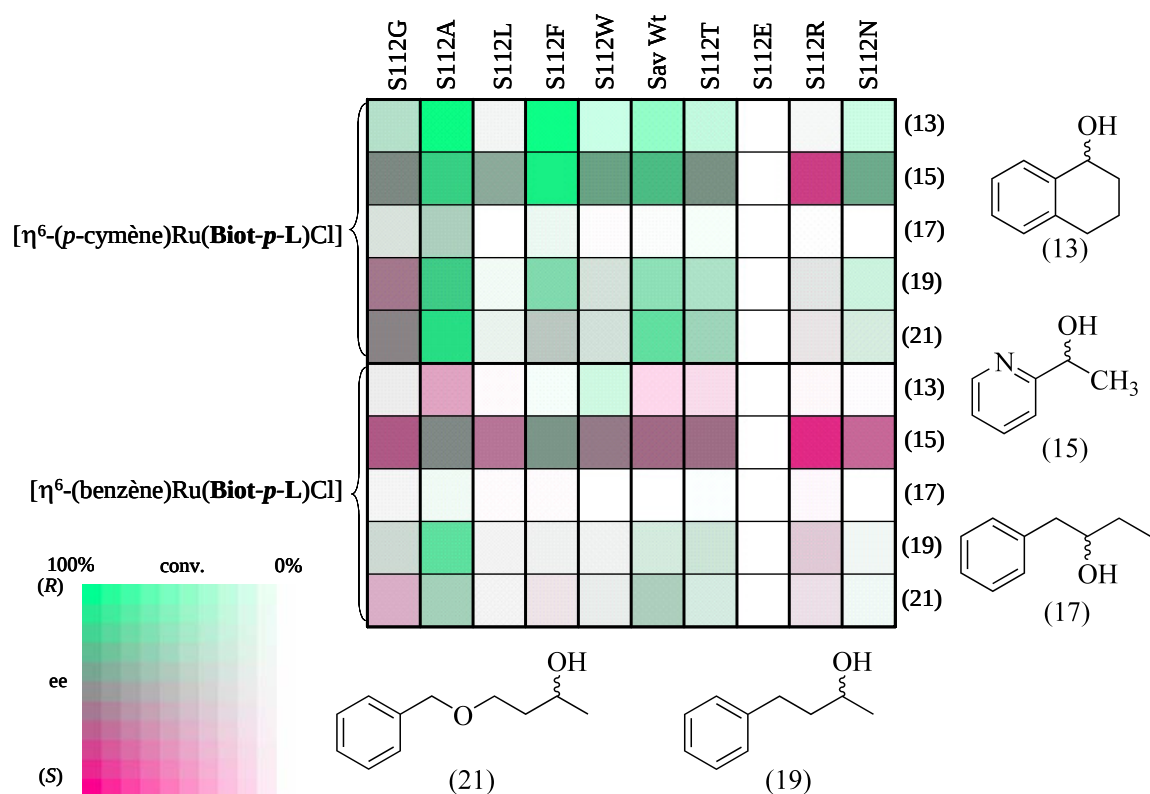


Figure II. 3.15 : Criblage des substrats (12), (14), (16), (18) et (20) en transfert hydrogénant avec 10 protéines et deux complexes biotinylés. Les tests catalytiques sont réalisés à 55° C pendant 64 heures en utilisant le mélange HCOONa (0.5 M) – acide borique (0.45 M) + MOPS (0.15 M) à $\text{pH}_{\text{initial}} = 6.25$. Le ratio HCOONa / S / C = 4000 / 100 / 1.

Avec les cinq substrats et les deux complexes testés, la présence du résidu acide glutamique (E), en position 112, inhibe la réaction et laisse supposer une coordination du motif carboxylate de ce résidu sur le métal.

Comme c'est le cas avec les dérivés de l'acétophénone (8a-c), le complexe $[\eta^6\text{-(p-cymène)Ru(Biot-p-L)Cl}]$ a tendance à orienter la sélectivité en faveur du produit (R) et le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-p-L)Cl}]$ favorise le plus souvent l'énantiomère (S) (figure II.3.15). Cette tendance peut être inversée avec certains mutants (entrées 3 et 5 du tableau II.3.2). Toutes les tendances observées lors des criblages précédents se confirment avec ces cinq autres substrats.

Entrée	Protéine	Complexes	Substrat	Conv. (%)	Ee (%)
1	Sav S112A	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	20	97	69 (R)
2	Sav S112A	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	18	98	48 (R)
3	Sav S112A	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	18	58	52 (R)
4	Sav S112A	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	16	71	30 (R)
5	Sav S112R	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	14	94	51 (S)
6	Sav S112R	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	14	95	70 (S)
7	Sav S112F	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	14	95	76 (R)
8	Sav S112F	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	12	70	96 (R)
9	Sav S112Y	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	12	79	97 (R)
10	Sav S112A	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	12	44	51 (S)

Les catalyses sont réalisées à 55° C durant 64 heures avec le mélange HCOONa (0.5 M) – acide borique (0.45 M) + MOPS (0.15 M) à $\text{pH}_{\text{initial}} = 6.25$. Le ratio HCOONa / S / C = 4000 / 100 / 1. Tous les résultats sont reproduits au minimum deux fois.

Tableau II. 3.2 : Résultats sélectionnés pour le transfert hydrogénant avec les substrats (12), (14), (16), (18), (20).

On notera que la sélectivité obtenue avec les substrats dialkyles ((16), (18) et (20)) est bien plus modeste (entrées 1, 2, 3, 4 et figure II.3.15) que pour les arylcétones ((12) et (14)). La conversion obtenue pour le produit (17) est faible comparativement à celle des produits (19) ou (21) (figure II.3.15). Il est probable que le groupement éthyle, plus encombrant que le groupement méthyle, contribue à cette diminution en limitant stériquement l'accès du carbonyle au métal. L'espacement entre le groupement phényle et le carbonyle ne semble pas être déterminant si l'on compare les résultats obtenus pour (18) et (20) (entrées 1 et 2). Pour le substrat (16), le meilleur résultat est obtenu avec $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}] \subset \text{Sav S11A}$ avec 71 % de conversion et un excès énantiomérique de 30 % (R) (entrée 4), soit 30 % de conversion en moins comparativement à (18) ou (20) (entrées 1 et 2).

On observe de très bons résultats avec le substrat (12), cyclique et plus contraint stériquement que les dérivés de l'acétophénone (8a-c). Avec le catalyseur hybride $[\eta^6\text{-(}p\text{-}$

cymène)Ru(**Biot-*p*-L**)Cl] $\subset$ Sav S11Y on obtient 79 % de conversion et un très bon excès énantiomérique de 97 % (*R*) (entrée 9).

Le substrat 2-acétylpyridine (14) donne de bons résultats. Avec [η^6 -(*p*-cymène)Ru(**Biot-*p*-L**)Cl] $\subset$ Sav S11F l'excès énantiomérique est de 76 % (*R*) (entrée 7). Avec le catalyseur [η^6 -(benzène)Ru(**Biot-*p*-L**)Cl] $\subset$ Sav S11R l'excès énantiomérique est de 70 % (*S*). En comparant les entrées 5 et 6 on pourrait parler d'un effet « match » ou « mis-match » entre le complexe et la protéine si l'on considère la sélectivité quand on combine S112R ((*S*) sélectif) et l'arène de type benzène ((*S*) sélectif) ou S112R et le ligand arène *p*-cymène ((*R*) sélectif) (entrées 5 et 6).

A noter que l'induction d'une sélectivité (*S*) par S112R est particulièrement marquée dans le cas du substrat 2-acétylpyridine (14) (figure II.3.15).

3.5. Considérations mécanistiques

La sélectivité est largement dictée par le complexe mais peut, dans certains cas, être contrebalancée par l'induction de la protéine. C'est notamment le cas des mutants qui possèdent un résidu cationique en position 112 (S112R et S112K), spécialement avec le 2-acétylpyridine (14) associé à S112R (entrée 5). Il est intéressant de pouvoir établir l'interaction substrat – protéine capable de favoriser si largement un des énantiomères, à la différence des autres substrats. Au pH de la catalyse, le motif guanidine en position S112 (S112R) se trouve protoné sous forme guanidinium ($pK_a = 12.5$). Le 2-acétylpyridine (14) a un $pK_a = 2.68^{[180]}$ et l'azote n'est donc pas protoné.

Dans un premier temps, il convient de s'assurer que les métalloenzymes artificielles se situent dans le même type de mécanisme que celui décrit par Noyori pour le transfert hydrogénant, impliquant un état de transition à 6 centres qui requiert le H_{axial} du ligand amino-sulfonamide pour protonner l'alcool en formation. Dans ce but, le ligand **Biot-*p*-LMe₂** est préparé puis combiné avec le *p*-cymène et le ruthénium pour former le complexe [η^6 -(*p*-cymène)Ru(**Biot-*p*-LMe₂**)Cl] (22) (figure II.3.16) qui est testé en catalyse.

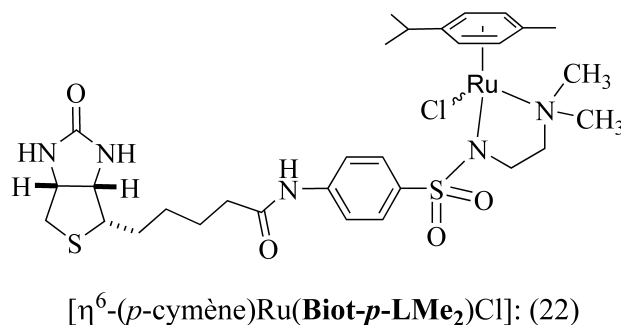


Figure II. 3.16 : Structure du complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-LMe}_2\text{)Cl}]$ (22).

Testé dans les conditions habituelles pour les enzymes artificielles, avec les trois dérivés de l'acétophénone (8a-c), le complexe (22) ne donne aucune conversion (Conv. < 2 %) que ce soit avec Sav Wt ou en l'absence de protéine. Testé avec l'acétophénone (8a) et le 2-acétylpyridine (14) en combinaison avec un résidu cationique S112K ou S112R, on n'observe pas non plus d'amélioration de la conversion. Cela suggère que le proton de la première sphère de coordination autour du métal est nécessaire et que le proton alcoolique du produit n'est vraisemblablement pas délivré par un acide aminé proche.

Si l'on prend en compte le résultat singulier obtenu avec Sav S112R et le 2-acétylpyridine (14) (figure II.3.15), comparativement aux autres substrats, (12), (8), (9), (11) ou à l'acétophénone (8a) (figure II.3.12) -stériquement très similaire au 2-acétylpyridine (14)-, il semble que l'azote du substrat (14) intervient dans le processus de discrimination des faces prochirales.

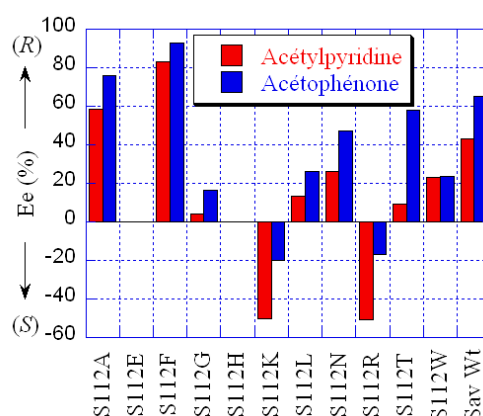


Figure II. 3.17 : Comparaison de la sélectivité en fonction de S112X pour les substrats 2-acétylpyridine (14) et acétophénone (8a) avec le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$.

En considérant les figures II.3.12, II.3.15 et II.3.17, il apparaît que la sélectivité obtenue pour les substrats (8a) et (14) présente toujours la même orientation ((*R*) ou (*S*)) et que l'excès énantiomérique est toujours inférieur avec le substrat 2-acétylpyridine (14), excepté pour les deux protéines S112K et S112R. Dans le cas de ces deux résidus cationiques, l'effet (*S*) inductif est beaucoup plus prononcé avec le substrat (14) ce qui souligne l'importance de la charge (ou de l'état de protonation) de cet acide aminé 112 vis-à-vis de ce substrat en particulier.

Ces observations suggèrent une interaction favorable entre le résidu S112R (ou S112K) et l'azote du substrat (14). Cette interaction serait à la base de l'accentuation de la discrimination en faveur de l'énantiomère (*S*).

Comme cela a été présenté dans le paragraphe II.2.5, le mécanisme proposé par Noyori^[47, 49, 54, 65] pour le transfert hydrogénéant suggère un état de transition à 6 centres avec une activation du carbonyle par le proton axial porté par le groupement amine du ligand. La discrimination des faces prochirales provient essentiellement de l'interaction CH- π qui stabilise un des états de transition. La différence d'énergie d'activation entre les deux états de transition diastéréoisomères est $\delta\Delta G^\ddagger = 2.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (issu de calculs théoriques d'après la référence^[68]).

En supposant la configuration du métal fixée par la protéine (en fonction de l'arène du complexe), on peut faire l'hypothèse que la sélectivité des métalloenzymes artificielles est, par la suite, largement guidée par l'interaction CH- π qui stabilise un des états de transition (stabilisation de ET-a). Toutefois, cette interaction peut être confortée ou déstabilisée par certains résidus acides aminés en position 112, comme c'est le cas des résidus cationiques, qui contrebalancent cette interaction et vont jusqu'à favoriser ET-b. Cet effet est plus marqué avec le 2-acétylpyridine (14) car l'état de transition ET-b est d'autant plus favorisé qu'il peut être stabilisé par une liaison hydrogène entre le résidu 112 protoné et l'azote du substrat (14). Cette stabilisation de ET-b se traduit par une augmentation plus marquée de la sélectivité en faveur de l'énantiomère (*S*), comparativement aux autres substrats testés. Ces différentes interactions sont schématisées dans la figure II.3.18.

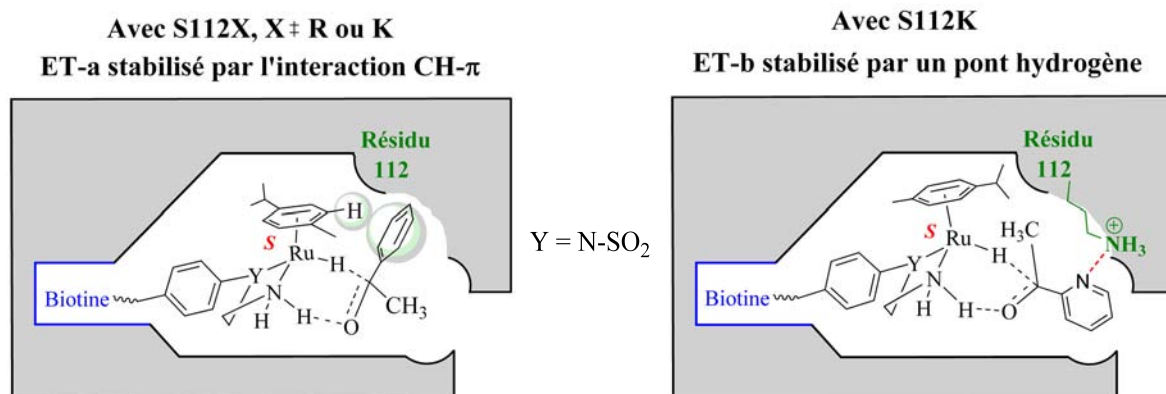


Figure II. 3.18 : Représentation schématique des états de transition possibles dans la protéine hôte. ET-a est stabilisé par l'interaction CH- π . Dans le cas du substrat (14), ET-b est stabilisé par l'interaction entre le 2-acétylpyridine et la lysine cationique de Sav S112K.

Afin de visualiser ces états de transition avec la structure tridimensionnelle de la protéine, les mimes des états de transition du complexe biotinylé [η^6 -(*p*-cymène)Ru(**Biot-*p*-L**)Cl] avec l'acétophénone sont construits (à partir de la référence^[181]) (figure II.3.19) et quelques simulations de docking sont réalisées avec la streptavidine Wt. Les résultats du docking sont qualitatifs mais permettent de mieux évaluer l'espace disponible et l'environnement probable autour du substrat.

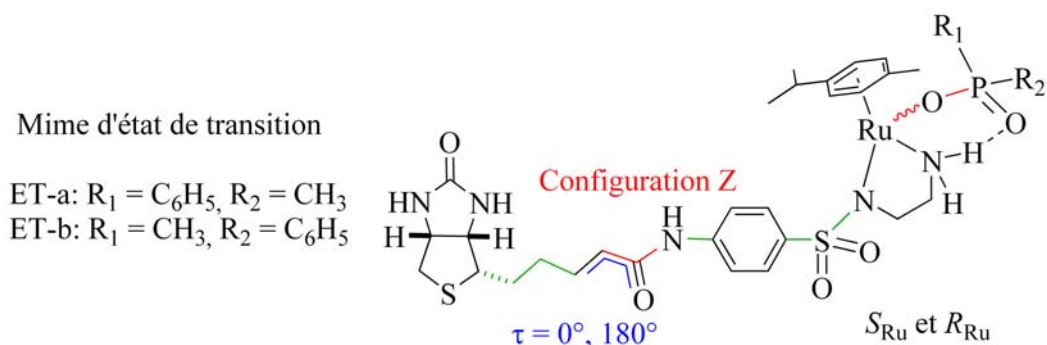


Figure II. 3.19 : Structure des mimes d'états de transition utilisés pour le docking. Les liaisons vertes sont optimisées, les rouges sont bloquées et l'angle fixée : $\tau = 0^\circ$ ou 180° (basée sur la structure^[181]).

Ces deux images (figure II.3.20) donnent une représentation possible des états de transition ET-a et ET-b dans la protéine hôte. Cela permet de se représenter

l'encombrement autour de ces états de transition et les interactions protéine – substrat qui peuvent s'établir dans le site actif.

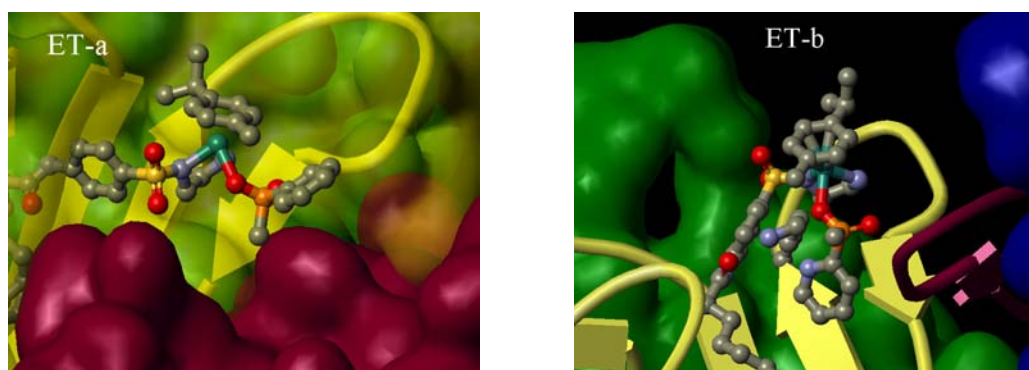


Figure II. 3.20 : Simulation en docking des mimes d'états de transition. ET-a montre une interaction CH- π . ET-b est représenté avec la lysine 112 et le substrat (14) (distance N-N = 2.6 Å).

On notera que le loop 7-8 est à proximité du complexe et du substrat. ET-a de la figure II.3.20 montre un état de transition stabilisé par l'interaction CH- π . Pour l'état de transition ET-b, concernant S112K avec le substrat (14), la figure II.3.20 (ET-b) donne une image plausible de la liaison hydrogène qui pourrait être impliquée dans le mécanisme de discrimination. Cette représentation fictive de l'état de transition ET-b donne une distance N – N d'environ 2.6 Å, crédible pour une liaison hydrogène.

Ce criblage en trois dimensions nous a permis d'identifier des catalyseurs hybrides très efficaces pour le transfert hydrogénant de dérivés carbonylés. On obtient 79 % de conversion et 97 % ee en faveur de l'énantiomère (*R*) avec le substrat α -tétralone (12) et le catalyseur $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)}\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{Sav S112Y}$ et également 95 % de conversion et 70 % ee en faveur de l'énantiomère (*S*) avec le substrat 2-acétylpyridine (14) et le catalyseur $[\eta^6\text{-(benzène)}\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{Sav S112R}$.

Nous avons également obtenu de précieux renseignements quant à l'environnement qui définit le site catalytique. Nous avons identifié différentes interactions susceptibles d'influencer la catalyse, tant au niveau de l'activité catalytique que des mécanismes qui régissent la sélectivité. Ces résultats permettent de confirmer l'importance de la seconde sphère de coordination de la protéine qui est capable d'agir sur le mécanisme en stabilisant

ou en déstabilisant un état de transition par des interactions stériques, polaires ou par des liaisons hydrogènes. Bien qu'il s'agisse encore d'hypothèses à démontrer, ces interactions peuvent se situer au niveau du complexe et du substrat. Pour cela, on suppose que la configuration du métal est fixée par une interaction protéine – complexe, due aux contraintes stériques imposées par la protéine sur le ligand arène. Afin de le démontrer, une co-cristallisation de protéine (S112X) en présence de complexes biotinylés en tabouret de piano (6) est actuellement à l'étude, en collaboration avec R. Stenkamp.^[182]

Dans le cas du 2-acétylpyridine avec la protéine Sav S112R, on montre que le substrat est favorablement orienté par la protéine. Cette interaction (protéine – substrat) laisse penser qu'il est possible d'orienter le substrat et la sélectivité de la réaction par un choix judicieux du complexe et de la protéine. Dans ce contexte et avec des substrats plus complexes ou qui possèdent des groupes fonctionnels spécifiques, on peut imaginer contrôler l'activité et la sélectivité de ces enzymes artificielles en ne permettant qu'à une seule des faces du substrat d'accéder au complexe hydrure. Comme c'est souvent le cas en catalyse enzymatique ces interactions non covalentes, protéine – substrat, permettraient également d'accélérer la cinétique de réaction en favorisant le rapprochement des réactifs et en stabilisant l'état de transition. Il est évident que la prédiction et le contrôle de ces interactions passent par une connaissance très pointue du site catalytique et des mécanismes qui entrent en jeu. A ce stade des connaissances, il est encore prématuré de penser pouvoir façonner un tel site catalytique, mais ces observations laissent entrevoir l'immense potentiel d'application de ces catalyseurs hybrides.

3.6. Exploration du loop 7-8

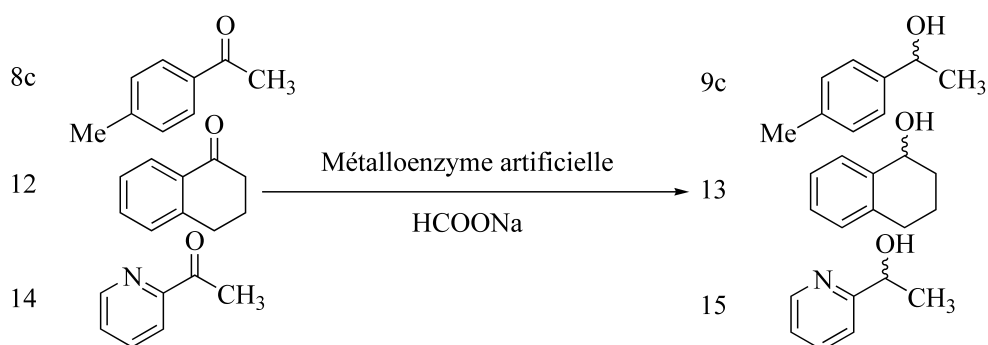
Aux vues des résultats précédents, des acides aminés plus éloignés du métal que la position 112, mais suffisamment proches pour interagir, notamment avec le substrat, apparaissent très intéressants. Les simulations de docking révèlent que le loop 7-8 est à proximité du site catalytique (figure II.3.4). Cet loop est composé de nombreux acides aminés polaires ou chargés, qui assurent l'interface entre le milieu aqueux et la cavité hydrophobe. Ils sont propices à former des interactions polaires ou des liaisons hydrogènes.

Afin d'explorer la capacité de ce loop à influencer la catalyse, différents acides aminés polaires ou chargés sont mutés.

Trois mutations sont envisagées. Elles sont proches les unes des autres afin d'évaluer une zone du loop 7-8. Les mutants T114G, T115A et E116A sont produits par les biologistes de notre groupe. La thréonine, polaire et peu encombrée, est remplacée par une glycine en position 114 et une alanine en position 115. Ces deux acides aminés sont tout deux petits et apolaires. L'acide glutamique en position 116, chargé négativement, est remplacé par une alanine.

Les deux complexes sélectionnés pour le criblage sont le $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ qui est le plus efficace des complexes (*R*) sélectif et le $[\eta^6\text{-(benzène)}\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ qui est le plus performant des complexe (*S*) sélectif.

Concernant les substrats, trois carbinols sont sélectionnés pour le criblage de cette zone du loop. Le 2-acétylpyridine (14) qui est très réactif et le plus susceptible d'être influencé par la mutation de charge. Le α -tétralone (12) qui est plus contraint du fait de sa structure bicyclique et qui présente souvent une bonne discrimination faciale. Le *p*-méthylacétophénone (8c) qui présente un encombrement minime à l'opposé de la fonction carbonylée et qui a donné de bons résultats dans les criblages précédents. Ces catalyses ont été réalisées conjointement avec Mlle A. Pordea et les résultats sont reportés dans le tableau II.3.3.



Entrée	Complexe	Protéine	Substrat	Conv. (%)	Ee (%)
1	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T114G	8c	88 / 85	91 / 96 (R)
2	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T114G	12	47 ^a / 42	86 ^a / 93 (R)
3	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T114G	14	99 ^a / 97	42 ^a / 27 (R)
4	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T114G	8c	43 / 29	35 / 31 (S)
5	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T114G	12	12 / 23	57 / 84 (S)
6	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T114G	14	99 ^a / 99	22 ^a / 63 (S)
7	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T115A	8c	71	94 (R)
8	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T115A	12	37	86 (R)
9	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T115A	14	98	18 (R)
10	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T115A	8c	20	40 (S)
11	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T115A	12	26	67 (S)
12	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	T115A	14	98	44 (S)
13	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	E116A	8c	57	93 (R)
14	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	E116A	12	19	83 (R)
15	$[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	E116A	14	97	15 (R)
16	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	E116A	8c	19	50 (S)
17	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	E116A	12	22	73 (S)
18	$[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$	E116A	14	95	53 (S)

Les catalyses sont réalisées à 55° C durant 64 heures avec le mélange HCOONa (0.5 M) – acide borique (0.45 M) + MOPS (0.15 M) à pH_{initial} = 6.25. Le ratio HCOONa / S / C = 4000 / 100 / 1. Résultats obtenus avec Sav Wt. a) Réaction réalisée avec un mélange de substrats.

Tableau II. 3.3 : Evaluation de trois mutations dans le loop 7-8 (T114, T115, E116) en transfert hydrogénant. Les résultats en gris ont été obtenus avec Sav Wt.

Les deux ligands arène (benzène et *p*-cymène) des complexes (6) favorisent une sélectivité inverse, quelque soit le substrat ou la mutation. Ce fait souligne qu'aucune des trois protéines n'est capable de contrebalancer l'orientation donnée par le complexe (entrées 1 à 3, 4 à 6, 7 à 9, 10 à 12, 13 à 15, 16 à 18).

La mutation T114G donne de bons résultats comparativement à Sav Wt (les résultats pour Sav Wt sont reportés en gris) avec des conversions similaires et une sélectivité supérieure, excepté dans le cas du 2-acétylpyridine (14) avec le complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ où l'excès énantiomérique chute à 27 % (*R*) (entrée 3). On note les bons résultats obtenus avec les substrats α -tétalone (12) et *p*-méthylacétophénone (8c) qui donnent respectivement après réduction, un excès énantiomérique de 93 % et 96 % en faveur de l'énantiomère (*R*) (entrées 1 et 2). Avec le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ on observe également une augmentation de la sélectivité, notamment avec les produits (13) et (15) dont l'excès énantiomérique augmente jusqu'à 84 % (*S*) pour (15) (entrée 5).

La mutation T115A est globalement moins bénéfique que T114G. D'une manière générale, on observe une baisse de la conversion comme de la sélectivité (entrées 1 vs. 7, 2 vs. 8, 5 vs. 11, 6 vs. 12). Comparativement à Sav Wt les résultats sont équivalents ou plus faibles (entrées 2 vs. 8 et 4 vs. 10), excepté pour le substrat (8c) (entrées 1 et 7).

La mutation E116A est semblable à T115A et moins bénéfique que T114G. Les conversions chutent nettement (entrées 1 vs. 13 et 2 vs. 14). Comparativement à Sav Wt, seul les résultats obtenus avec le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ sont favorables. Concernant le substrat (8c), on obtient la meilleure sélectivité (*S*) avec le catalyseur $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}] \subset$ Sav E116A avec une faible conversion (19 %) (entrée 16).

Ce criblage d'une zone du loop 7-8, a permis d'améliorer la sélectivité des métalloenzymes artificielles. On obtient de bons excès énantiomériques, notamment pour le produit (9c) en faveur de l'énantiomère (*R*) et pour le composé (13) en faveur de l'énantiomère (*S*). L'avantage de la technologie biotine – (strept)avidine réside dans l'immense potentiel de variabilité offert par les techniques de mutagenèse. De plus, les variations chimiques, spécialement au niveau du ligand arène, offrent un moyen simple et intéressant pour varier la sélectivité. Le criblage systématique d'un maximum de protéines avec différents complexes semble pertinent pour optimiser ces catalyseurs hybrides. Néanmoins, une telle approche nécessite un investissement de temps conséquent. Afin de

rendre le criblage systématique réalisable, la mise au point d'une méthode d'analyse à haut débit est nécessaire.

4. Ouverture vers le criblage à haut débit

L'engouement que connaît la catalyse asymétrique pour la chimie combinatoire est largement motivé par notre incapacité à prévoir la combinaison métal – ligand idéale ou d'anticiper l'effet de variations structurales et/ou électroniques du ligand sur la réactivité et la sélectivité d'un complexe. Parallèlement à cela, l'émergence des nouveaux catalyseurs hybrides alliant une optimisation chimique et génétique permet désormais de générer rapidement une très grande diversité de catalyseurs. Malheureusement, la quantification de l'énantiosélectivité par des techniques classiques (HPLC et GC chirales) s'avère laborieuse et demande un temps d'analyse long (parfois jusqu'à 30-50 min par échantillon). Bien que de nouvelles techniques se développent, ces moyens de criblage à haut débit de l'énantiosélectivité sont encore très limités, coûteux en appareillage ou peu appropriés. Par ailleurs, toutes ces techniques d'analyse sont d'autant plus contraignantes qu'elles sont le plus souvent incompatibles avec la présence de protéines ou de sels. Au cours des premiers mois de criblage, beaucoup de temps a été investi pour mettre au point une méthode analytique par chromatographie gazeuse (GC) fiable et durable. Lors de ces essais, trois colonnes chirales ont été endommagées en quelques jours après seulement une dizaine d'injections. Pour remédier au problème, il a été nécessaire d'extraire chaque échantillon de catalyse pour récupérer les produits, puis de purifier le brut de réaction avant de l'injecter en GC. En HPLC, les colonnes chirales sont plus robustes et moins sensibles aux impuretés, mais les temps d'analyse sont longs (plus de 35 min dans certains cas). Avec ces méthodes, le temps investi pour le traitement et l'analyse des échantillons représente une sérieuse limitation dans le criblage des metalloenzymes artificielles.

4.1. Méthode ELISA pour un criblage des catalyseurs par des anticorps

Mioskowski et al.^[39] ont récemment décrit une méthode de criblage qui emploie des anticorps monoclonaux capables de renseigner à la fois la conversion et la sélectivité d'une réaction. Avec cette technique, basée sur le principe d'un dosage immunologique compétitif, ils ont pu identifier des catalyseurs énantiosélectifs pour la réduction de dérivés carbonylés.

4.1.1. Principe du dosage immunologique compétitif

Deux anticorps énantiospécifiques sont nécessaires pour déterminer à la fois la conversion et la sélectivité d'une réaction. Chacun de ces anticorps est spécifique d'un des deux énantiomères issus de la catalyse (l'affinité varie du micro- au nanomolaire en fonction de l'anticorps et du substrat). Chaque énantiomère est dosé séparément par son anticorps en plaque ELISA (96 puits) (figure II.4.1 a)). Connaissant la quantité de substrat introduite, le résultat du dosage respectif de chaque énantiomère permet de calculer la conversion ainsi que l'excès énantiomérique de la catalyse. C'est un dosage compétitif puisque l'énantiomère se fixe sur l'anticorps en déplaçant un équivalent de marqueur (protéine acétylcholinestérase : AChE) préalablement fixé sur l'anticorps. En réalité, c'est le marqueur resté fixé qui est quantifié. Après plusieurs lavages, la quantification des protéines « marquées » avec un réactif (réactif d'Ellman) permet d'estimer la quantité de chaque énantiomère formé durant la catalyse. Le produit de la réaction enzymatique entre le marqueur et le réactif d'Ellman est directement mesuré par une lecture de la densité optique (DO à 420 nm), inversement proportionnelle à la quantité d'énantiomère fixé (figure II.4.1 b)).

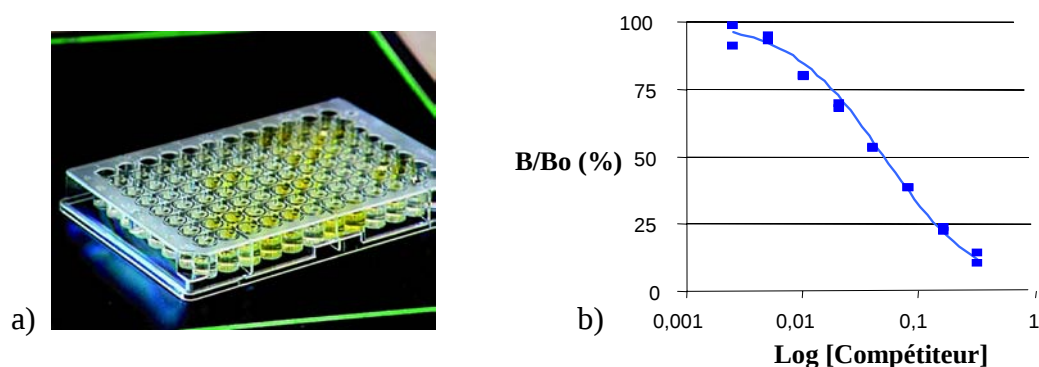


Figure II. 4.1 : a) Plaque ELISA pour un dosage type. b) Dosage compétitif, fonction de la concentration du compétiteur (énantiomère). B_0 : Absorbance en l'absence de compétiteur.

Selon la technique ELISA, les anticorps énantiospécifiques issus de cellules immunitaires de souris sont ancrés dans les puits des plaques ELISA grâce à des anticorps anti-anticorps de souris. Cette technique permet d'immobiliser n'importe quel anticorps énantiospécifique issu de la souris.

Afin de développer une méthode de criblage à haut débit compatible avec la présence de protéine, nous nous sommes intéressés à la réduction énantiosélective, par les métalloenzymes artificielles, de deux dérivés de l'acide benzoyle formique (α -cétoacide aromatique), qui conduisent à des dérivés de l'acide mandélique (figure II.4.2). L'équipe du docteur F. Taran au C.E.A dispose des anticorps énantiospécifiques de ces composés.

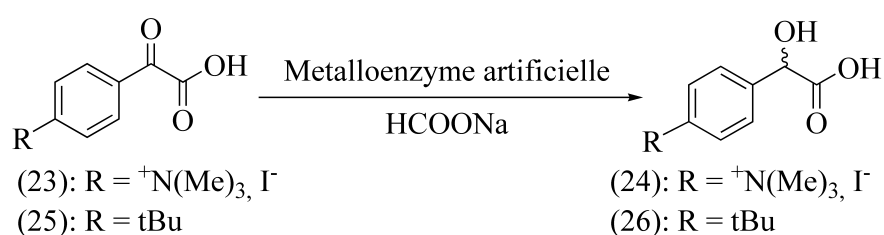


Figure II. 4.2 : Réduction asymétrique des α -cétoacides (23) et (25) par les métalloenzymes artificielles en transfert hydrogénant.

Les anticorps mAb 6 et mAb 8 sont respectivement spécifiques des énantiomères (*R*) et (*S*), de l'acide 4-(*N*, *N*, *N*-triméthylamonium)-mandélique (24) ou de l'acide 4-tBu-mandélique (26). Ainsi durant l'étape de lavage tout ce qui n'est pas retenu par les

anticorps énantiospécifiques est éliminé. Ce dosage immunologique compétitif est schématisé par la figure II.4.3.

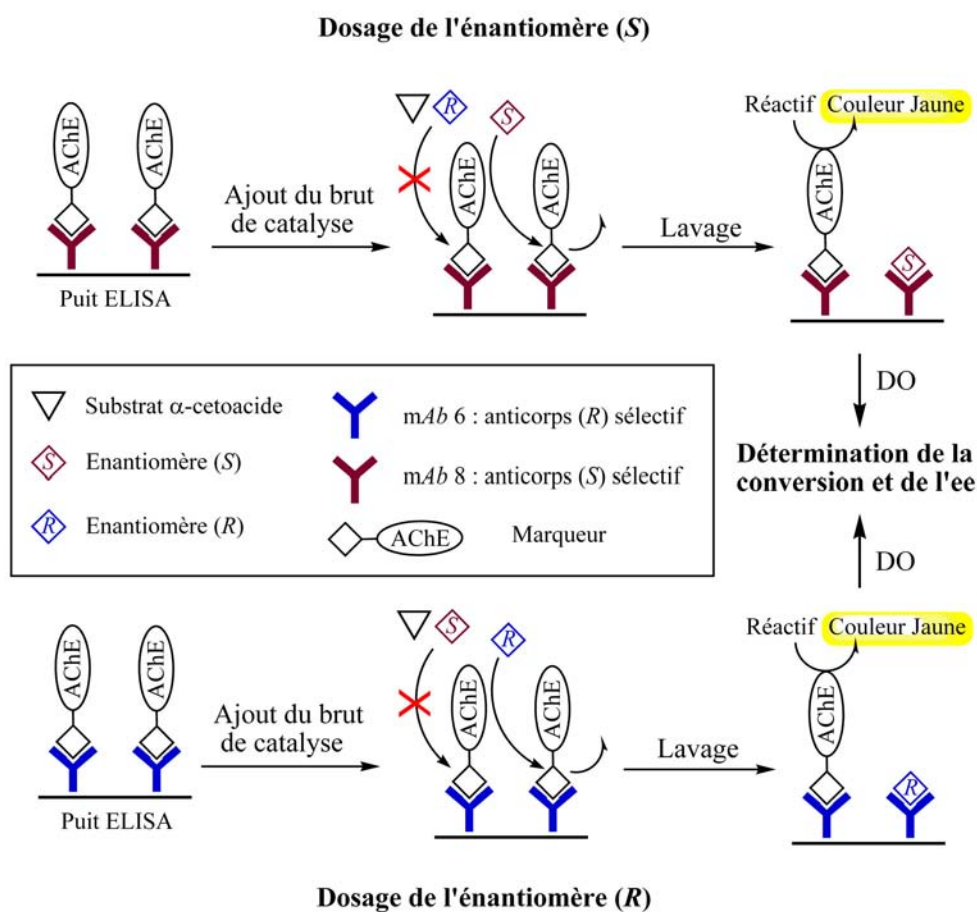


Figure II. 4.3 : Principe du dosage immunologique compétitif énantiospécifique.

4.1.2. Le criblage des métalloenzymes artificielles

Un criblage des métalloenzymes artificielles pour le transfert hydrogénant avec ces deux substrats chargés présente un double intérêt. D'une part, cela permet d'évaluer l'efficacité de ces catalyseurs hybrides avec ce type de substrat. D'autre part, cela permet de tester la méthode de quantification des catalyses par les anticorps, afin de s'inscrire par la suite dans une démarche systématique de criblage à haut débit des métalloenzymes artificielles.

Sur la base des résultats obtenus précédemment pour le transfert hydrogénant de cétones aliphatiques et carbinols, différentes combinaisons de complexes et protéines sont

sélectionnées pour les deux substrats α -cétoacide (23) et (25). Au total, 70 combinaisons de métalloenzymes artificielles sont évaluées (les résultats sont présentés en mode empreintes digitales). Les catalyses ont été réalisées conjointement avec Mlle A. Pordea.

Avec cette première table de résultats (sous forme d'empreintes digitales) nous évaluons 11 complexes en combinaison avec 2 protéines (Sav Wt et Sav P64G) et ceci pour les deux substrats (figure II.4.4).

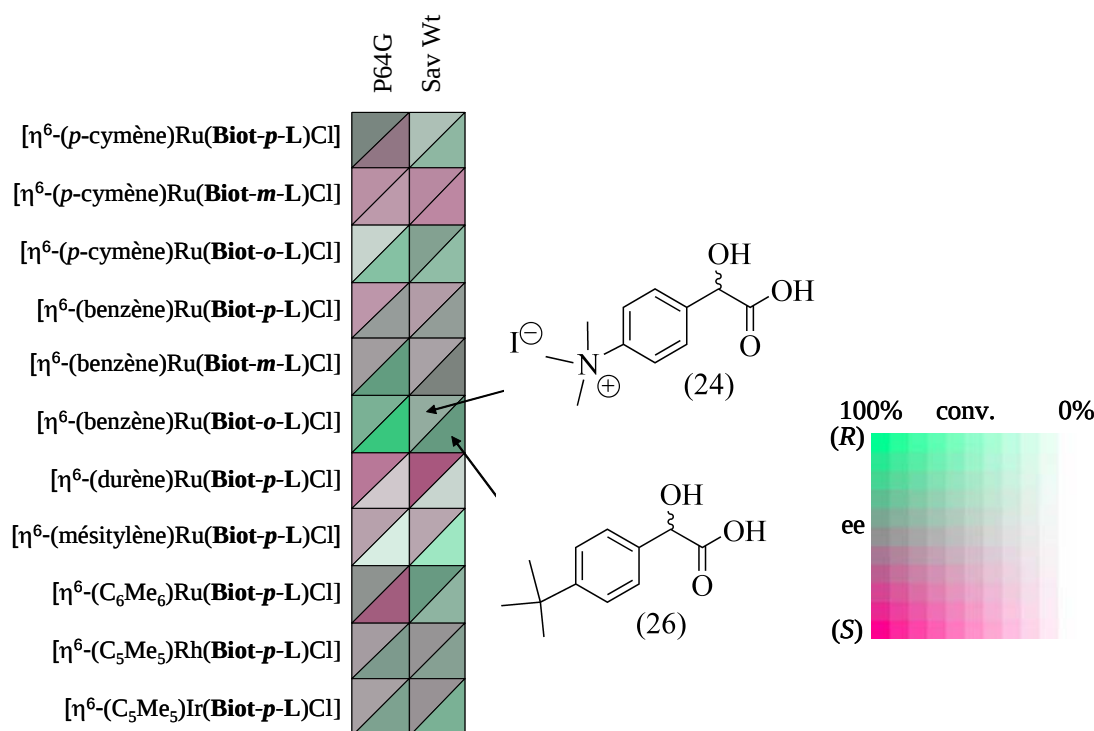


Figure II. 4.4 : Les catalyses sont réalisées à 55° C durant 64 heures avec le mélange HCOONa (0.5 M) – acide borique (0.45 M) + MOPS (0.15 M) au $\text{pH}_{\text{initial}} = 6.25$. Le ratio $\text{HCOONa} / \text{S} / \text{C} = 4000 / 100 / 1$. La quantification de la conversion et de l'excès énantiomérique est réalisée avec la méthode des anticorps.

Ayant établi l'importance de la position S112 de la streptavidine, la plus proche du métal dans le site catalytique, 7 mutants S112X sont testés. L'influence de mutations distantes du site est également évaluée avec les mutants K80G, V47G et P64G.

Par ailleurs, il a été montré que des acides aminés chargés pouvaient contrôler la sélectivité dans le cas d'un substrat apte à former des interactions hydrogènes. Dans ce contexte et en considérant les charges portées par les deux substrats, les trois mutants du loop 7-8 sont évalués (T114G, T115A et E116A).

Trois doubles mutants sont également testés. Ces mutants comportent la mutation S112G proche du site catalytique qui est combinée, soit à une mutation distante du site (S112G-V47G), soit à une mutation dans le loop 7-8 (S112G-N118T) ou à une mutation proche du loop 7-8 (*via* le loop 4-5 du monomère adjacent) (S112G-P64G). La table des résultats est présentée sous forme d'empreintes digitales (figure II.4.5).

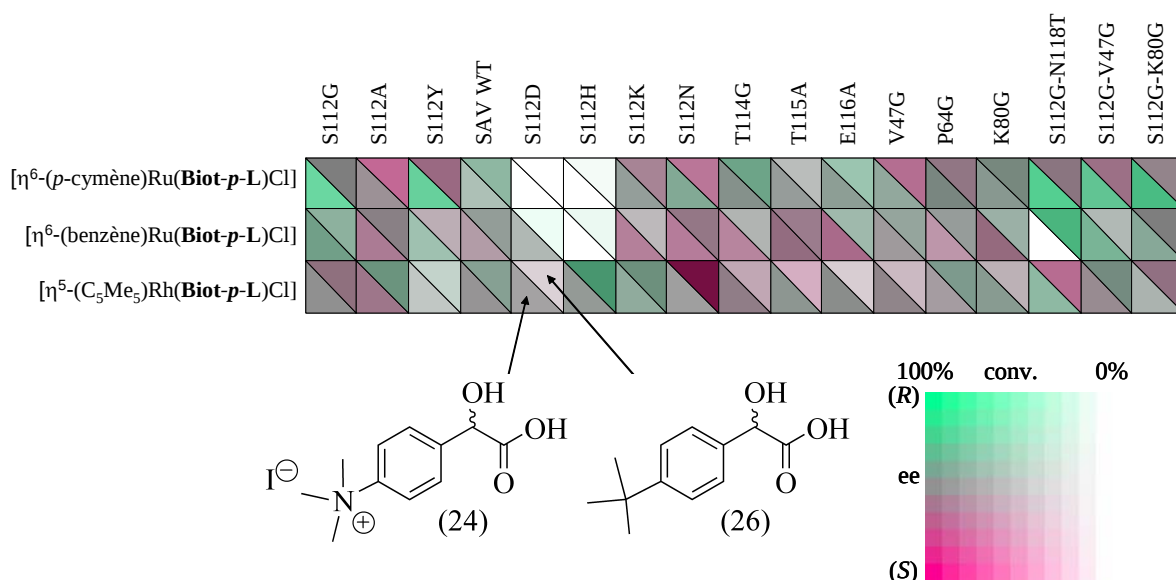


Figure II. 4.5 : Les catalyses sont réalisées à 55° C durant 64 heures avec le mélange HCOONa (0.5 M) – acide borique (0.45 M) + MOPS (0.15 M) à pH_{initial} = 6.25. Le ratio HCOONa / S / C = 4000 / 100 / 1. La quantification de la conversion et de l'excès énantiomérique est réalisée avec la méthode des anticorps.

Les conversions pour ces deux substrats sont très bonnes et sont équivalentes malgré la présence du groupement électroattracteur $^+\text{NMe}_3$ en *para* de la fonction carbonylée pour le substrat (23). D'une manière générale, la sélectivité s'avère relativement modeste (figures II.4.4 et II.4.5).

On notera que ces deux substrats fournissent, dans plus de la moitié des cas, une sélectivité inverse avec une même métalloenzyme artificielle (inversion des couleurs pour deux triangles adjacents). En considérant que les groupements tBu et $^+\text{NMe}_3$ possèdent un encombrement stérique comparable, ces résultats suggèrent une discrimination des faces prochirales due à des interactions polaires relatives à la charge du groupement $^+\text{NMe}_3$ ($\Delta\text{Ee} = 71\%$ avec $[\eta^6\text{-(mésitylène)Ru(Biot-p-L)Cl}] \subset \text{Sav Wt}$).

La position de la biotine sur le ligand (*ortho*, *mé*ta ou *para*) influence la sélectivité. On observe une inversion de la sélectivité en passant du catalyseur $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}\mathbf{m}\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{P64G}$ au catalyseur $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}\mathbf{o}\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{P64G}$ ($\Delta_{ee} = 54\%$ avec le substrat (25)).

La présence d'acides aminés coordonnants en position S112, comme l'histidine (S112H) ou l'acide aspartique (S112D), inhibe l'activité catalytique, excepté pour les metalloenzymes à base de rhodium et le catalyseur $[\eta^6\text{-(benzène)}\text{Ru}(\text{Biot-}\mathbf{p}\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112D}$, uniquement avec le substrat ammonium (23) (figure II.4.5). Pour ce dernier, on peut penser que le groupement ammonium est capable d'interagir avec le carboxylate (S112D). Si le résidu S112D interagit avec le groupement ammonium plutôt qu'avec le métal, celui-ci se trouve à nouveau capable de catalyser le transfert hydrogénant. La présence de ce groupement chargé positivement pourrait être à la base du rétablissement de la réactivité. Concernant le fait que les catalyseurs au rhodium ne sont pas inhibés par les résidus S112X coordonnants, il est difficile à ce stade d'émettre une hypothèse cohérente. Il est néanmoins vraisemblable que le groupement carboxylate du substrat entre en ligne de compte dans le rétablissement de la réactivité.

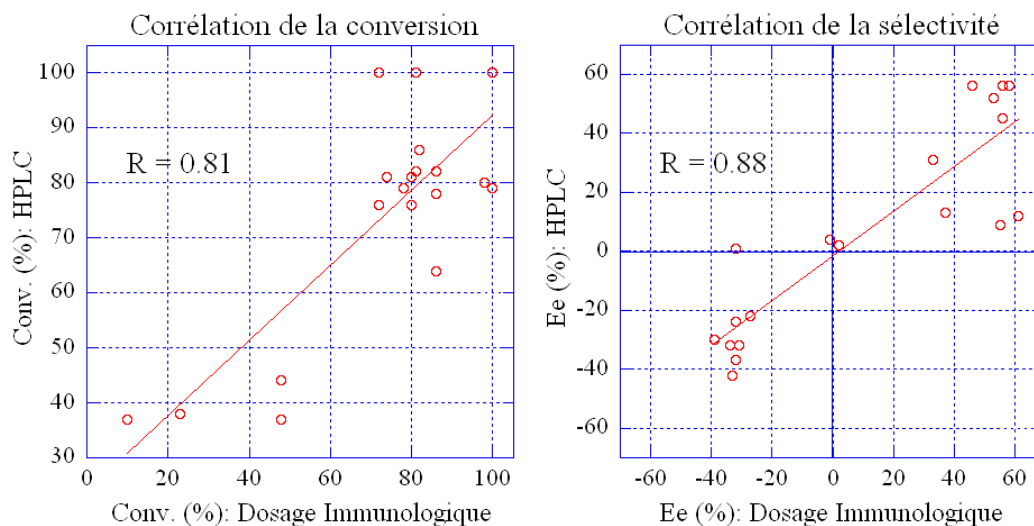
Les mutations dans le loop 7-8 sont comparables et peu différentes de Sav Wt. Cela suggère que ces 3 positions interfèrent peu ou pas dans les mécanismes qui régissent la sélectivité avec ces substrats, pour les trois complexes biotinylés testés. A noter tout de même une inversion modeste de la configuration avec le substrat (25) ($\Delta_{ee} = 42\%$ entre T115A et Sav Wt avec $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5)\text{Rh}(\text{Biot-}\mathbf{p}\text{-L})\text{Cl}]$) (figure II.4.5).

Les mutations S112Y et S112G donnent des résultats parmi les plus intéressants également quand la mutation S112G est combinée avec N118T (double mutant Sav S112G-N118T). Les meilleurs catalyseurs hybrides (*R*) sélectifs avec le substrat (23) sont le $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)}\text{Ru}(\text{Biot-}\mathbf{p}\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112Y}$ (conversion 78 %, 53 % (*R*) ee), le $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)}\text{Ru}(\text{Biot-}\mathbf{p}\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112G}$ (conversion 74 %, 58 % (*R*) ee) et le $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)}\text{Ru}(\text{Biot-}\mathbf{p}\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112G-N118T}$ (conversion 86 %, 56 % (*R*) ee). Avec le substrat (25), la meilleure sélectivité (*R*) est obtenue avec le catalyseur $[\eta^6\text{-(benzène)}\text{Ru}(\text{Biot-}\mathbf{o}\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{P64G}$ (conversion 100 %, 56 % (*R*) ee). Le meilleur résultat (*S*) est obtenu pour le substrat (25) avec $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)}\text{Ru}(\text{Biot-}\mathbf{p}\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112A}$ (conversion 83 %, 43 % (*S*) ee).

4.2. Validation de la méthode aux anticorps pour les enzymes artificielles

Afin de vérifier que la présence de streptavidine n'influence pas la titration immunologique, la protéine a été retirée par filtration après la catalyse et le résultat comparé avec la même catalyse non filtrée. Bien que différents, les résultats de ce doublon sont comparables avec 13% de variation sur l'excès énantiomérique et 16% sur la conversion. La marge d'erreur reportée pour ce type de dosage par les anticorps est de 9 %.^[39] Par ailleurs les variations de l'excès énantiomérique sont généralement plus importantes pour une réaction peu sélective (différence d'énergie faible). Par conséquent une erreur de 16 %, cumulée sur la réaction et sur le dosage, reste tout à fait acceptable pour un criblage qualitatif de première intention.

Pour valider la méthode de criblage immunologique des métalloenzymes artificielles, une vingtaine de résultats significatifs sont comparés avec un dosage réalisé par HPLC (figure II.4.6). Les titrations immunologiques et HPLC ont été réalisées au C.E.A. de Saclay conjointement avec Dr. P. Vicennati et Mme A. Pordea et Mme A. Ivanova.



Le facteur de corrélation R est assez faible en ce qui concerne la conversion ($R = 0.81$), mais demeure toutefois acceptable pour un premier criblage. Le principe est d'isoler les meilleurs candidats, qui une fois identifiés sont à nouveau testés en catalyse et étudiés plus précisément si le résultat est concluant. De manière à affiner cette corrélation, il est nécessaire d'employer plus de points dans toutes les gammes de conversions, notamment de 0 à 70 %. Concernant la sélectivité, le facteur de corrélation est acceptable ($R = 0.88$).

Cette méthode semble valable pour le criblage des métalloenzymes artificielles. La méthode est simple, rapide, et permet de quantifier des concentrations faibles de produits ou de substrat (jusqu' à 10^{-9} mol.l⁻¹). Cette méthode ne requiert aucun traitement en fin de catalyse. L'analyse est directement pratiquée sur le brut de réaction. Avec un lecteur de plaques ELISA et un automate pour le transfert des solutions, un millier de catalyses pourraient être analysées par jour. Afin de se placer réellement dans le haut débit, de la conception du catalyseur à l'analyse des résultats, différents tests sont entrepris pour réaliser le transfert hydrogénant directement dans le milieu de culture de la protéine. La suppression des étapes de purification de la protéine doit permettre d'obtenir plus rapidement une multitude de mutants. Combiné à la méthode de quantification immunologique, cela permet d'envisager un premier criblage efficace à haut débit des métalloenzymes artificielles.

- CHAPITRE III -

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

Cette étude a permis de développer une nouvelle génération de catalyseurs hybrides efficaces pour le transfert hydrogénant asymétrique de cétones.^[183] En combinant 21 complexes avec plus de 20 protéines, nous avons étudié une librairie de plus de 400 catalyseurs. Avec différents substrats, ces metalloenzymes artificielles se sont révélées hautement sélectives. Nous avons obtenu des excès énantiomériques de 97 % en faveur de l'énantiomère (*R*) avec le catalyseur $[\eta^6\text{-}(p\text{-cymène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112Y}$ et de 84 % en faveur de l'énantiomère (*S*) avec le catalyseur $[\eta^6\text{-}(\text{benzène})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{T114G}$. Ces résultats ont été obtenus après une évolution chimio-génétique du système.

Nous avons observé que la diversité peut être amenée chimiquement par des modifications du complexe organométallique biotinylé. Dans de nombreux cas, la substitution d'un ligand arène par un autre arène, plus ou moins encombré, peut induire une sélectivité inverse, permettant d'obtenir les deux énantiomères avec de bons excès énantiomériques. Des mutations de la protéine hôte permettent de moduler et d'augmenter la sélectivité. Nous avons constaté que les mutations à proximité du site catalytique (position 112 et loop 7-8) représentent une bonne stratégie d'optimisation de la sélectivité.

Dans certains cas, plusieurs mutations peuvent être efficacement conjuguées (doubles mutants S112G – P64G, S112G – N118T) pour augmenter les bénéfices en termes de conversion ou de sélectivité. A ce stade, le cumul des effets des mutations (additif, partiellement additif, antagoniste, etc...) reste empirique. Néanmoins, une étude plus approfondie du site actif, en mutant simultanément deux ou trois acides aminés voisins^[120], pourrait permettre d'identifier les zones du site actif qui influent sur la catalyse. Cela permettrait également d'étudier le cumul des effets apportés par chaque résidu muté. Il est probable que des acides aminés contigus soient interdépendants et qu'une telle approche permette une optimisation fine des interactions qui ont lieu dans le site actif. En considérant uniquement 10 acides aminés proche du site catalytique, cela représente 20^{10} combinaisons de protéines hôtes potentiellement efficaces pour le transfert hydrogénant de dérivés

carbonylés. Il est évident que le point fort d'un tel système réside dans son potentiel d'évolution et de variabilité, quasiment infinis.

On notera que ce système combine efficacement certains aspects de la catalyse homogène et de la catalyse enzymatique. Contrairement à une enzyme native, ces catalyseurs hybrides présentent une grande tolérance en termes de substrats. Ce système permet de différencier l'activité catalytique, assurée par le complexe, de la sélectivité qui est assurée par la protéine. La dissociation sélectivité – activité présente certains avantages car plusieurs types de réaction peuvent être envisagés (oxydation d'alcool^[184], hydrogénation d'oléfines^[154, 156]) simplement en changeant le résidu organométallique (métaux, première sphère de coordination) ou les conditions de réaction (cofacteur d'oxydoréduction, etc.). Contrairement aux catalyseurs homogènes, la seconde sphère de coordination autour du métal est bien définie et permet de contrôler la sélectivité.

Le docking associé à la mutagenèse de saturation, en position 112, a permis de mieux visualiser le site catalytique probable et de rationaliser les interactions, protéine – complexe et protéine – substrat, qui peuvent intervenir dans le mécanisme de la catalyse. Bien qu'il s'agisse encore d'hypothèses, les résultats obtenus avec le 2-acétylpyridine (14) semblent montrer qu'il est possible d'orienter un substrat et de favoriser un état de transition par des interactions hydrogènes.

La méthode de quantification de la conversion et de la sélectivité avec les anticorps nous permet désormais d'envisager un criblage à haut débit des métalloenzymes artificielles. Un criblage à haut débit systématique doit permettre d'identifier plus rapidement des catalyseurs efficaces et de réunir des informations supplémentaires sur le site actif. Actuellement, Mlle A. Pordea et les biologistes du groupe expérimentent des tests catalytiques directement dans le milieu de culture de la protéine. Allié à la quantification par les anticorps, cela permettrait de cribler rapidement un grand nombre de catalyseurs. Toutefois la méthode de quantification immunologique présente certaines limitations. Pour chaque substrat, il est nécessaire de synthétiser un antigène (haptène) correspondant aux produits de la réaction puis d'isoler les anticorps monoclonaux énantiospécifiques performants. Cela requiert un équipement spécifique et s'avère parfois délicat. Cette partie pourrait être développée dans la continuité avec l'équipe du Dr. C. Mioskowski et notamment Dr. F. Taran et Dr. C. Créminon au C.E.A..

Concernant les perspectives pour le transfert hydrogénant par les métalloenzymes artificielles, l'investigation du site catalytique pourrait être poursuivie, en introduisant diverses mutations, notamment dans le loop 7-8. Afin d'évaluer différentes zones du site actif, les mutations pourraient être introduites sur 2 ou 3 acides aminés voisins, selon la stratégie du CASTing^[120].

Ayant établi les bases du système^[185], il pourrait être intéressant de tester d'autres substrats. Comparativement aux catalyseurs homogènes, les conditions particulières de ce système hybride (eau et acides aminés polaires ou chargés) peuvent se révéler avantageuses avec des substrats hautement fonctionnalisés. Par exemple, la présence d'une amine libre souvent pénalisante pour un catalyseur homogène pourrait être utilisée par les métalloenzymes artificielles pour orienter le substrat (interaction protéine – substrat). Afin de continuer la recherche dans ce sens, le pas suivant serait de concevoir ces interactions ou d'arriver à les prévoir, notamment en employant des substrats possédant des fonctions, comme des amines, des acides carboxyliques, des alcools, des halogènes ou encore des fonctions soufrées, susceptibles de donner des interactions fortes avec la protéine. Dans ce contexte, on pourrait imaginer « façonner » un site actif adapté à chaque substrat, en introduisant des acides aminés aptes à former des interactions pour orienter ce dernier.

Sur la base des résultats obtenus avec les substrats (16) et (18), la régiosélectivité des métalloenzymes pourraient être étudiée afin de discriminer deux fonctions cétones qui présentent un encombrement stérique différent ((18) groupement méthyle $\neq$ (16) groupement éthyle). Ce type d'application est intéressant quand on connaît la difficulté d'un catalyseur homogène à distinguer deux cétones similaires sur une même molécule.

Enfin, de manière à étendre le champ d'application des catalyseurs hybrides et de la technologie biotine – (strept)avidine en particulier, d'autres réactions catalytiques peuvent être développées, comme des couplages carbone – carbone (type Suzuki ou addition de Michael) ou des oxydations énantiosélectives (époxydation, sulfoxydation ou oxydation d'alcools^[184]). La plupart de ces travaux sont d'ores et déjà en développement dans le groupe.

- CHAPITRE IV -

MATERIEL & METHODES

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 employés sont également détaillés.

1. Abréviations et glossaire

$\subset$:	Inclus dans
Å :	Angström
AChE :	Acétylcholinestérase
ACN :	Acétonitrile
Avi:	Avidine
(BOC) ₂ O :	Di-tert-buthyl-dicarbonate
Bipy :	Bipyridine
BisTris :	2, 2-Bis(hydroxyméthyl)-2, 2', 2''-nitrolotriéthanol (pKa = 6.4)
C :	Catalyseur
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CD :	Dichroïsme circulaire
CDMT :	2-Chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine
Conv. :	Conversion
Cp* :	Pentaméthylcyclopentadiényle
Cste :	Constant(e)
DCM :	Dichlorométhane
DiPEA :	N, N'-Diisopropyléthylamine
DMF :	N, N'-Diméthylformamide

DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DO :	Densité optique
ee :	Excès énantiomérique
eq. :	Equivalent
Et :	Ethyle
GC :	Chromatographie en phase gazeuse
Hz :	Hertz
HPLC :	Chromatographie en phase liquide (High pressure liquid chromatography)
IBCF :	Isobutylchloroformiate
IP :	Indexe de polarité des solvants
IPA :	Isopropanol
iPr :	Isopropyle
M :	Molaire (mol.l ⁻¹)
Me :	Méthyle
MES :	Acide 2-(<i>N</i> -morpholino)éthanesulfonique (pKa = 6.15)
min :	Minute
mmol :	10 ⁻³ mole
MOPS :	Acide 3-(<i>N</i> -morpholino)propanesulfonique (pKa = 7.2)
NMM :	<i>N</i> -méthylmorpholine
Rdt :	Rendement
RT :	Température ambiante (Room Temperature)
S :	Substrat
Sav :	Streptavidine
t :	Temps en heures (h.) ou en minutes (min.)
T° C :	Température en degré Celsius
tBu :	Terbutyle
TFA :	Acide trifluoroacétique
TOF :	Turnover frequency (mole de produit / mole de catalyseur / temps de réaction)
TON :	Turnover number (mole de produit / mole de catalyseur)
TsDPEN :	<i>N</i> -(<i>p</i> -tolylsulfonyl)-1,2-diphényléthylènediamine
UV :	Ultraviolet

v / v :	Indique une proportion en volume / volume
vs :	<i>Versus</i>
Wt :	Type sauvage (Wild type)

2. Réactifs et solvants

L'origine et le degré de pureté des réactifs et des solvants utilisés sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Produit	Origine	Degré de pureté
Acétonitrile	Acros	≥ 99.9 %
Acétophénone (8a)	Fluka	≥ 98 % (GC)
Acétylpyridine (14)	Fluka	≥ 98 % (GC)
Acide borique	Fluka	99.5 %
Avidine	Belovo	-
4-Benzyloxy-2-butanone (20)	Fluka	≥ 97 % (GC)
(+)-Biotine	Chanzhou Huaren	≥ 99 %
BisTris	Fluka	≥ 99 %
(BOC) ₂ O	Acros	97%
4-Bromoacétophénone (8b)	Acros	98%
CDMT	Aldrich	≥ 97 %
[η^n -(C _n R _n)MCl ₂] ₂	UMICORE	-
DiPEA	Fluka	≥ 98 %
DMF	Fluka	≥ 99.8 % (GC)
DMSO	Acros	≥ 99.9 % (GC)
Eau	-	MilliQ
Et ₃ N	Acros	99%
Ether	Acros	≥ 99.9 % (GC)
Ethylènediamine	Fluka	≥ 99 % (GC)
EtOH	Merck	≥ 99.9 %

Formiate de sodium	Merck	99.5 %
Hexane	Acros	98.2 % (GC)
Isopropanol	Merck	≥ 99.9 % (GC)
MeOH	Riedel-de-Haën	≥ 99.9 %
MES	Fluka	≥ 99.5
4-Méthylacétophénone (8c)	Acros	95%
MOPS	Fluka	≥ 99.5
2-Nitrobenzenesulfonyl chloride	Lancaster	97%
3-Nitrobenzenesulfonyl chloride	Acros	97%
4-Nitrobenzenesulfonyl chloride	Acros	95%
NMM	Fluka	≥ 98 %
Pd / C	Aldrich	10 % Pd
1-Phenyl-2-butanone (16)	Aldrich	98%
4-Phenyl-2-butanone (18)	Aldrich	98%
RuCl ₃ , xH ₂ O	Acros	35-40 % Ru
Silice (SiO ₂)	Brunschwig 32-63 60 Å	-
Streptavidine	-	-
α-Tétralone (12)	Aldrich	98 % (GC)
TFA	Fluka	≥ 98 %
Toluène	Fluka	≥ 99.7 % (GC)
2,2,2-Trifluoroacétophénone	Aldrich	99%

3. Appareillages

3.1. 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 en quartz. Les données sont traitées avec Excel.

3.2. Résonance magnétique nucléaire : RMN (NMR)

Les spectres ^{13}C , ^1H sont enregistrés sur un spectromètre 400 MHz (Bruker) ou à 200 MHz (Varian). Les analyses ^{19}F sont obtenues avec le spectromètre 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).

3.3. 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). Les colonnes chirales utilisées sont la OB-H, la OD-H (Daicel Chemical Industries, Tokyo) ou la colonne (S,S)-ULMO (Regis Technologies Inc., Illinois, U.S.A.).

3.4. Chromatographie gazeuse : GC

Les spectres et analyses sont réalisés sur un appareil GC HP 5890 avec la colonne β -Dex 120 (Supelco, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm). L'hélium (He) est utilisé comme gaz vecteur. Les conditions de température et les temps de rétentions de chaque produit sont détaillés dans la partie expérimentale.

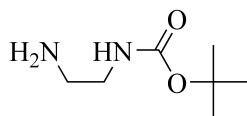
3.5. Spectrométrie de masse : MS

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.

4. Experimental procedure for the synthesis of the d6-piano stool complexes incorporating biotinylated ligands Biot-*q*-LH (*q* : *ortho*, *meta*, *para*)

All reactions were carried out under an inert atmosphere using standard Schlenk techniques, dry and degassed solvents. All biotinylated ligands were synthesized according to the same general procedure described below:

4.1. *N*-BOC-ethylenediamine : (1)

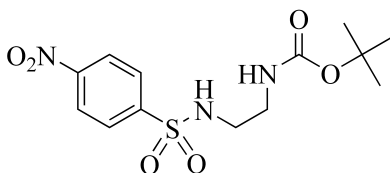


This compound was synthesized according to the literature^[186]. This colorless oil was obtained 79 % yield 79%. NMR analysis was in good agreement with the literature.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, 22°C): δ 1.37 (s, 9H; tBu), 1.65 (br, 2H; NH), 2.70 (m, 2H; CH₂-CH₂-NH), 3.12 (m, 2H; CH₂-CH₂-NH), 5.40 (br, 1H; NH).

4.2. *N*-BOC-*N'*-(*q*-Nitrophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (2)

4.2.1. *N*-BOC-*N'*-(4-Nitrophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (*para*)

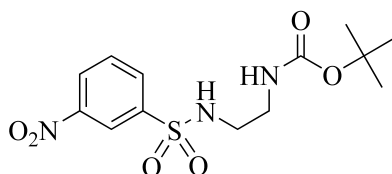


A CH₂Cl₂ solution (100 mL) containing 4-nitrophenylsulfonyl chloride (2.51 g, 11.3 mmol, 1.05 eq.) was added dropwise at 5 °C to a solution of *N*-BOC-ethylenediamine¹ (1.74 g, 10.8 mmol, 1.0 eq.) and Et₃N (3 mL, 21.5 mmol, 2.0 eq.) in CH₂Cl₂ (300 mL). After stirring overnight at RT, the solution was concentrated to 100 mL, washed with water (3 x 20 mL), dried with Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The

crude product was purified by flash chromatography (silicagel, EtOAc : Hexane (2 : 3)) to afford the pure product as a white powder (2.60 g, 7.57 mmol, 70% yield).

^1H NMR (200 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 22 °C): δ 1.40 (s, 9H; tBu), 3.03 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 3.12 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 4.47 (br, 2H; NH), 8.04 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H; ArH), 8.37 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H; ArH).

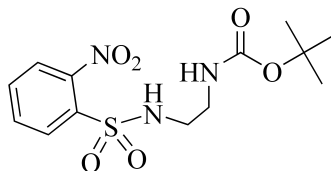
4.2.2. *N*-BOC-*N'*-(3-Nitrophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (*meta*)



This compound was obtained as a pale yellow powder (71% yield).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 22 °C): δ 1.4 (3s, 9H; tBu), 3.05 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 3.26 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 4.99 (br, 1H; NH), 7.76 (m, 1H; ArH), 8.22 (m, 1H; ArH), 8.43 (m, 1H; ArH), 8.70 (m, 1H; ArH).

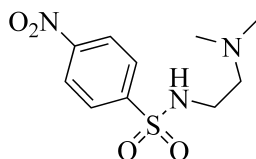
4.2.3. *N*-BOC-*N'*-(2-Nitrophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (*ortho*)



This compound was obtained as a pale yellow powder (58% yield).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 22 °C): δ 1.42 (s, 9H; tBu), 3.10-3.30 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 4.85 (br, 1H; NH), 5.75 (br, 1H; NH), 7.75-7.80 (m, 2H; ArH), 7.88 (m, 1H; ArH), 8.14 (m, 1H; ArH).

4.3. *N,N*-Dimethyl-*N'*-(4-nitrophenylsulfonyl)-ethylenediamine :

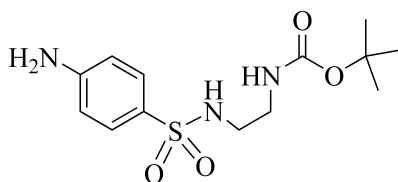


A CH₂Cl₂ solution (150 mL) of 4-nitrophenylsulfonyl chloride (3.50 g, 15.8 mmol, 1.02 eq.) was added dropwise at RT to a solution of *N,N*-dimethyl-ethylenediamine (1.7 mL, 15.5 mmol) and Et₃N (2.2 mL, 15.5 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (300 mL). The reaction mixture was stirred at RT overnight and water (50 mL) was added. The organic phase was washed with water (3 x 20 mL), dried with Na₂SO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was obtained as a beige powder (4.10 g, 15.0 mmol, 97% yield) and used with no further purification.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 22 °C): δ 2.10 (s, 6H; N-(CH₃)₂), 2.37 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H; CH₂-CH₂-NH-S), 3.05 (m, *J* = 5.7 Hz, 2H; CH₂-CH₂-NH-S), 5.47 (br, 1H; NH), 8.08 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H; ArH), 8.37 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H; ArH).

4.4. *N*-BOC-*N'*-(*p*-Aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (3)

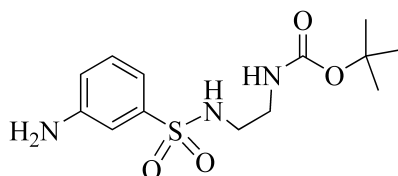
4.4.1. *N*-BOC-*N'*-(4-Aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (*para*)



An autoclave containing a suspension of Pd/C (5%, 330 mg) in methanol (20 mL) was charged with *N*-BOC-*N'*-(4-Nitrophenylsulfonyl)-ethylenediamine (2.10 g, 6.08 mmol). The autoclave was purged three times with nitrogen and filled with hydrogen (3 bars). The reaction was vigorously stirred for 3 hours at RT, the hydrogen pressure was carefully released and the suspension removed by filtration through a celite plug. The organic solvent was evaporated to dryness to offer the crude product as a white powder (1.90 g, 6.05 mmol, quantitative yield).

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 22 °C): δ 1.40 (s, 9H; tBu), 2.88 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 3.12 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 3.57 (br, 3H; NH ; NH_2), 4.50 (br, 1H; NH), 6.62 (m, 2H; ArH), 7.47 (m, 2H; ArH).

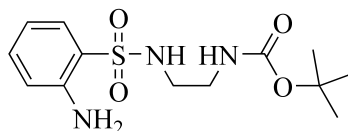
4.4.2. *N*-BOC-*N'*-(3-Aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (*meta*)



This compound was obtained as a white powder (quantitative yield).

^1H NMR (200 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 22 °C): δ 1.36 (s, 9H; tBu), 2.73 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 2.95 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 4.01 (s, 3H; NH_2 ; NH), 6.75 (m, 2H; ArH; NH), 6.90 (m, 1H; ArH), 6.99 (m, 1H; ArH), 7.18 (dd, J = 8.0 Hz, 1H; ArH).

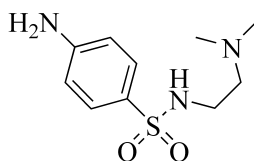
4.4.3. *N*-BOC-*N'*-(2-Aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (*ortho*)



This product was obtained as a pale yellow powder (quantitative yield).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 22 °C): δ 1.44 (s, 9H; tBu), 3.00 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 3.15 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 4.93 (br, 2H; NH), 5.21 (br, 2H; NH), 6.85 (m, 2H; ArH), 7.35 (m, 1H; ArH), 7.75 (m, 1H; ArH).

4.5. *N,N*-Dimethyl-*N'*-(4-aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine

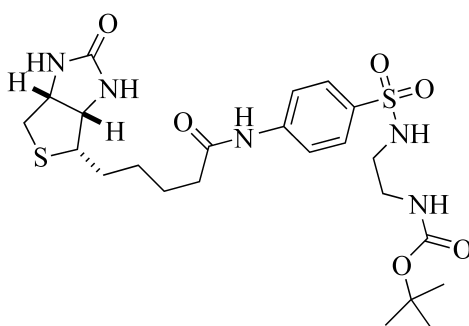


This product was obtained as a white powder (quantitative yield).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 22 °C): δ 2.07 (s, 6H; $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$), 2.31 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 2.93 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 4.2 (br, 2H; NH_2), 5.0 (br, 1H, NH), 6.68 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H; ArH), 7.63 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H; ArH).

4.6. *N*-BOC-*N'*-(*q*-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (4)

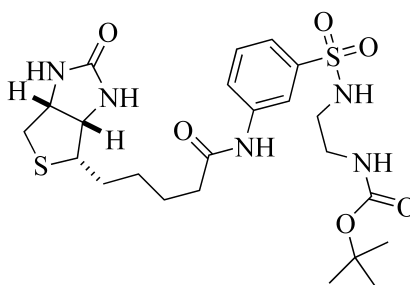
4.6.1. *N*-BOC-*N'*-(4-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (*para*)



A suspension of (+)-biotin (1.4 g, 5.74 mmol, 1.02 eq.), *N*-BOC-*N'*-(4-aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine (1.77 g, 5.63 mmol, 1.0 eq.) and CDMT (2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine) as coupling agent^[187] (1.08 g, 5.96 mmol, 1.06 eq.) were mixed in acetonitrile (110 mL) and *N*-methylmorpholine (0.93 mL, 8 mmol, 1.5 eq.) was added. The mixture was stirred at RT for 24 hours and then heated to reflux for 3 hours. After cooling to RT, water (30 mL) was added and the solution was concentrated under reduced pressure to afford a slurry, as the product precipitated. The crude product was collected by filtration, washed with CH_2Cl_2 and purified by flash chromatography (silicagel using EtOAc : MeOH (4 : 1)) to afford the product as a white powder (1.24 g, 2.30 mmol, 41% yield).

^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 22 °C): δ 1.20-1.78 (m, 15H; CH_2 ; tBu), 2.30 (m, 2H; CH_2), 2.60-2.88 (m, 4H; $\text{CH}_2\text{-S}$; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 2.95-3.15 (m, 3H; CH-S ; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 4.18 (br, 1H; CH-N), 4.38 (br, 1H; CH-N), 6.28 (br, 3H; NH), 7.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H; ArH), 7.72 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H; ArH).

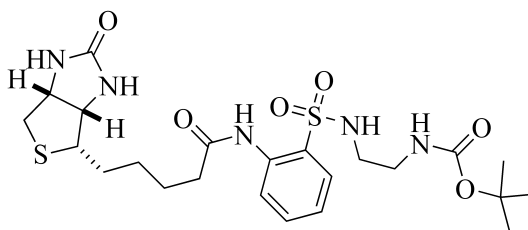
4.6.2. *N*-BOC-*N'*-(3-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (*meta*)



The product was obtained as a pale yellow powder (34% yield).

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6 , 22 °C): δ 1.28-1.85 (m, 15H; tBu; CH_2), 2.22 (m, 2H; CH_2), 2.53 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.66-2.80 (m, 3H; $\text{CH}_2\text{-S}$; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 2.93-3.00 (m, 3H; CH-S ; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 4.11 (br, 1H; CH-N), 4.28 (br, 1H; CH-N), 5.62 (br, 1H; NH), 5.84 (br, 1H, NH), 6.05 (br, 1H; NH), 6.97 (m, 1H, ArH), 7.20 (m, 1H; ArH), 7.84 (m, 2H; ArH, NH), 9.63 (s, 1H; NH).

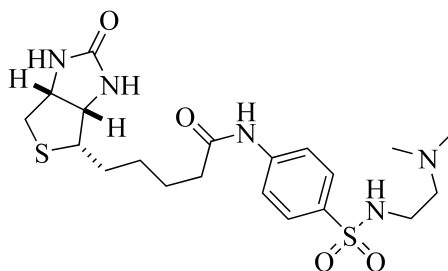
4.6.3. *N*-BOC-*N'*-(2-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : (*ortho*)



This compound was obtained as a yellow powder (24% yield).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 22 °C): δ 1.20-1.88 (m, 15H; CH_2 ; tBu), 2.45 (m, 2H; CH_2), 2.65-3.20 (m, 7H, $\text{CH}_2\text{-S}$; CH-S ; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 4.18 (br, 1H; CH-N), 4.38 (br, 1H; CH-N), 7.20 (m, 2H; ArH; NH), 7.55 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H; ArH), 7.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H; ArH), 8.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H; ArH), 9.2 (s, 1H; NH).

4.7. *N,N*-Dimethyl-*N'*-(4-biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine: Biot-*p*-LMe₂ (22)

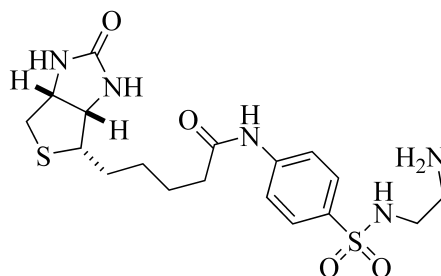


N,N-dimethyl-*N'*-(4-aminophenylsulfonyl)-ethylenediamine (0.5 g, 0.2 mmol, 1 eq.), (+)-biotin pentafluorophenyl ester^[170, 188] (1.1 g, 0.26 mmol, 1.3 eq.) and diisopropylethylamine (0.5 mL, 3 mmol, 14.5 eq.) were introduced in a Schlenk flask containing dimethylformamide (25 mL). The solution was stirred at 80 °C for 24 hours. The solvent was evaporated to dryness under high vacuum and the crude product was purified by flash chromatography (silicagel using AcOEt : EtOH (3 : 1) to afford the product as a brown oil (39 mg, 83 μmol, 41.5% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 22 °C): δ 1.24-1.60 (m, 6H; CH₂), 2.43 (m, 8H; N(CH₃)₂; CH₂), 2.59-2.62 (m, 2H; CH₂-CH₂-NH-S), 2.69-2.75 (m, 3H; CH₂-CH₂-NH-S; CH₂-S), 2.76-2.87 (m, 1H; CH₂-S), 3.05 (m, 1H; CH-S), 3.97 (br, 2H; NH), 4.24 (br, 1H; CH-N), 4.48 (br, 1H; CH-N), 5.80 (br, 1H; NH), 6.69 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H; ArH), 7.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H; ArH); ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃, 22 °C): δ 24.7 (CH₂), 28.4 (CH₂), 28.5 (CH₂), 35.8 (CH₂), 40.9 (CH₂-S), 43.5 (CH₂-CH₂-NH-S), 45.3 (N(CH₃)₂), 56.0 (CH-S), 58.1 (CH₂-CH₂-NH-S), 60.5 (CH-N), 62.4 (CH-N), 114.2 (2C; Ar-H), 126.3 (2C; Ar-H), 130.3 (Ar-S), 152.8 (Ar-N), 164.3 (N-CO-N), 173.5 (CO-N) ; ESI-MS for C₂₀H₃₁N₅O₄S₂: 470.2 (100) [M+H]⁺.

4.8. *N'*-(*q*-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : Biot-*q*-LH (5)

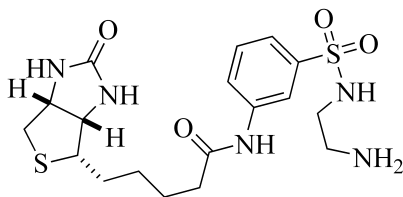
4.8.1. *N'*-(4-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : Biot-*p*-LH



The BOC-protecting group was hydrolyzed using trifluoroacetic acid, as described in the literature.^[189] Trifluoroacetic acid (2.3 mL, 30 mmol, 10 eq.) was added dropwise to a stirred suspension of *N*-Boc-*N'*-(Biotin-4-Amidophenylsulfonyl)-ethylenediamine (1.60 g, 2.95 mmol) in dry CH₂Cl₂ (150 mL) at 0 °C. After stirring at RT for 6 hours, the reaction mixture was evaporated to dryness *in vacuo*, redissolved in water and the pH was adjusted to 9 with a saturated Na₂CO₃ solution. The aqueous layer was concentrated to afford a white precipitate which was collected by filtration and purified through filtration through silicagel plug with EtOH as eluent (1.14 g, 2.60 mmol, 88% yield).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 22 °C): δ 1.23-1.63 (m, 6H; CH₂), 2.35 (m, 2H; CH₂), 2.58 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H; CH₂-S), 2.69 (br s, 2H; CH₂-CH₂-NH-S), 2.82 (dd, *J* = 12.4, 4.9 Hz, 1H; CH₂-S), 2.89 (m, 2H; CH₂-CH₂-NH-S), 3.12 (m, 1H; CH-S), 3.48 (br, 2H; NH₂), 4.15 (br, 1H; CH-N), 4.31 (br, 1H; CH-N), 5.33 (br, 1H; NH), 6.44 (br, 1H; NH), 6.58 (br, 1H; NH), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H; ArH), 7.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H; ArH), 10.6 (br, 1H; NH); ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d*₆, 22 °C): δ 25.8 (CH₂), 28.9 (CH₂), 29.0 (CH₂), 37.0 (CH₂), 40.7 (CH₂-S), 41.3 (CH₂-CH₂-NH-S), 46.5 (CH₂-CH₂-NH-S), 56.2 (CH-S), 60.1 (CH-N), 61.9 (CH-N), 119.5 (2C; Ar-H), 128.4 (2C; Ar-H), 134.8 (Ar-S), 143.6 (Ar-N), 163.7 (N-CO-N), 172.8 (CO-N); ESI-MS for C₁₈H₂₇N₅O₄S₂: 464.2 (15) [M+Na]⁺, 442.3 (100) [M+H]⁺.

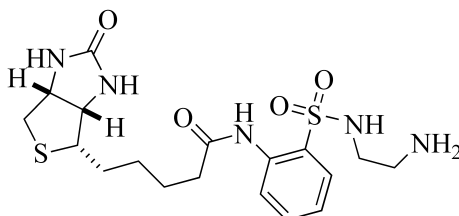
4.8.2. *N'*-(3-(+)-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : **Biot-*m*-LH**



This compound was obtained as a yellow powder (95% yield)

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 22 °C): δ 1.33-1.70 (m, 6H; CH_2), 2.38 (m, 2H; CH_2), 2.49-2.60 (m, 3H; $\text{CH}_2\text{-S}$; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 2.74-2.88 (m, 3H; $\text{CH}_2\text{-S}$; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 3.12 (m, 1H; CH-S), 4.15 (m, 1H; CH-N), 4.31 (m, 1H; CH-N), 5.60 (br, 1H; NH), 6.42 (br, 1H; NH), 6.48 (br, 1H; NH), 7.42-7.52 (m, 2H; ArH), 7.81 (m, 1H; ArH), 8.23 (m, 1H; ArH) 10.6 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100.6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 22 °C): δ 25.8 (CH_2), 28.9 (CH_2), 29.0 (CH_2), 37.0 (CH_2), 39.7 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 40.9 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 46.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 56.2 (CH-S), 60.0 (CH-N), 61.9 (CH-N), 117.6 (Ar-H), 121.5 (Ar-H), 123.2 (Ar-H), 130.3 (Ar-H), 140.8 (Ar-S), 141.7 (Ar-N), 163.6 (N-CO-N), 172.6 (CO-N); ESI-MS for $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2$: 464.2 (10) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 442.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4.8.3. *N'*-(2-Biotinamidophenylsulfonyl)-ethylenediamine : **Biot-*o*-LH**



This compound was obtained as a yellow-orange hygroscopic powder (89% yield).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , 22 °C): δ 1.43-1.70 (m, 6H; CH_2), 2.55 (m, 2H; CH_2), 2.72 (d, J = 12.7 Hz, 1H; $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.94-3.02 (m, 3H; $\text{CH}_2\text{-S}$; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 3.13 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-S}$), 3.25 (m, 1H; CH-S), 3.78 (br, 1H; NH_2), 4.36 (m, 1H; CH-N), 4.54 (m, 1H; CH-N), 7.35 (m, 1H; ArH), 7.64 (m, 1H; ArH), 7.93 (m, 1H; ArH), 8.17 (m, 1H; ArH); ^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD , 22 °C): δ 24.3 (CH_2), 28.5 (CH_2), 28.7 (CH_2), 37.0 (CH_2), 39.8 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 40.0 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 41.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 55.9 (CH-S), 60.7 (CH-N), 62.4 (CH-N), 124.9 (Ar-H), 125.1 (Ar-H), 129.5 (Ar-H), 133.9 (Ar-H), 135.9 (Ar-S), 136 (Ar-

N), 161.9 (N-CO-N), 174.9 (CO-N); ESI-MS for $C_{18}H_{27}N_5O_4S_2$: 464.1 (30) $[M+Na]^+$, 442.3 (100) $[M+H]^+$.

5. General procedure for the synthesis of $[\eta^n-(C_nR_n)M(\text{Biot-L})X]$ (6) and (22).

All the $[\eta^n-(C_nR_n)MCl_2]_2$ were commercially available or prepared according the literature (with M = Ru, Ir, Rh).^[190, 191]

M = Ru, Ir, Rh

Biot-L = **Biot-*q*-LH**, **Biot-bipy**, **Biot-*p*-LMe₂**

X = Cl, H₂O

5.1. Synthesis of $[\eta^6-(C_nR_n)Ru(\text{Biot-*q*-L})Cl]$

(C_nR_n = benzene, *p*-cymene, durene, hexamethylbenzene, mesitylene, *q* = *ortho*, *meta*, *para*). The ruthenium dimer $[\eta^6-(\text{arene})RuCl_2]_2$ (38.8 μmol , 1.00 eq.), the biotinylated ligand **Biot-*q*-LH** (37.8 mg, 85.5 μmol , 2.20 eq.[§]) and Et₃N (12.5 μL , 90 μmol , 2.25 eq.) were dissolved in isopropanol (2.0 mL) and heated at 80 °C for 2 hours. The solvent was removed *in vacuo* to afford a red-brown to yellow powder which was stored under nitrogen until use. For catalysis purposes, the crude catalyst precursor $[\eta^6-(\text{arene})Ru(\text{Biot-*q*-L})Cl]$ was dissolved in degassed dimethylformamide to give a final stock solution with $[Ru] = 0.0395$ M. This stock-solution can be stored for several days at RT under nitrogen without any noticeable loss in activity or in selectivity.

$[\eta^6-(p\text{-cymene})Ru(\text{Biot-*p*-LMe}_2)Cl]$ was synthesized using same procedure.

[§] For the synthesis of $[\eta^6-(p\text{-cymene})Ru(\text{Biot-*o*-L})Cl]$, $[\eta^6-(\text{benzene})Ru(\text{Biot-*o*-L})Cl]$, $[\eta^6-(\text{mesitylene})Ru(\text{Biot-*p*-L})Cl]$, $[\eta^6-(\text{mesitylene})Ru(\text{Biot-*m*-L})Cl]$ the ligand was introduced using 2.00 eq. (instead of 2.20 eq.) vs. ruthenium.

All complexes were characterized by mass spectroscopy:

ESI-MS for $\text{RuC}_{28}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2\text{Cl}$: $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$: 676.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$; $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru(Biot-}m\text{-L)Cl}]$: 734.1 (30) $[\text{M+Na+H}]^+$ 676.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$; $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru(Biot-}o\text{-L)Cl}]$: 698 (30) $[\text{M-Cl+Na}]^+$, 734.1 (40) $[\text{M+Na+H}]^+$, 676.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$.

ESI-MS for $\text{RuC}_{28}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2\text{Cl}$: $[\eta^6\text{-(durene)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$: 442.1 (5) $[\text{LH+H}]^+$, 676.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$; $[\eta^6\text{-(durene)Ru(Biot-}m\text{-L)Cl}]$: 734.1 (45) $[\text{M+H+Na}]^+$, 676.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$; $[\eta^6\text{-(durene)Ru(Biot-}o\text{-L)Cl}]$: 698 (8) $[\text{M-Cl+Na}]^+$, 734.1 (40) $[\text{M+H+Na}]^+$, 676.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$.

ESI-MS for $\text{RuC}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2\text{Cl}$: $[\eta^6\text{-(benzene)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$: 442.1 (35) $[\text{LH+H}]^+$, 620.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$; $[\eta^6\text{-(benzene)Ru(Biot-}m\text{-L)Cl}]$: 678 (25) $[\text{M+H+Na}]^+$, 442.1 (35) $[\text{LH+H}]^+$, 620.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$; $[\eta^6\text{-(benzene)Ru(Biot-}o\text{-L)Cl}]$: 678 (30) $[\text{M+H+Na}]^+$, 620.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$.

ESI-MS for $\text{RuC}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2\text{Cl}$: $[\eta^6\text{-(mesitylene)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$: 442.1 (35) $[\text{LH+H}]^+$, 662.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$; $[\eta^6\text{-(mesitylene)Ru(Biot-}m\text{-L)Cl}]$: 442.1 (10) $[\text{LH+H}]^+$, 720.1 (45) $[\text{M+H+Na}]^+$, 662.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$; $[\eta^6\text{-(mesitylene)Ru(Biot-}o\text{-L)Cl}]$: 720.1 (20) $[\text{M+H+Na}]^+$, 662.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$.

ESI-MS for $\text{RuC}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2\text{Cl}$: $[\eta^6\text{-(hexamethylbenzene)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$: 442.1 (30) $[\text{LH+H}]^+$, 704.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$; $[\eta^6\text{-(hexamethylbenzene)Ru(Biot-}m\text{-L)Cl}]$: 762.1 (15) $[\text{M+H+Na}]^+$, 704.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$; $[\eta^6\text{-(hexamethylbenzene)Ru(Biot-}o\text{-L)Cl}]$: 762.1 (20) $[\text{M+H+Na}]^+$, 704.1 (100) $[\text{M-Cl+H}]^+$.

ESI-MS for $\text{RuC}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2\text{Cl}$: $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru(Biot-}p\text{-LMe}_2\text{)Cl}]$: 726 (100) $[\text{M-Cl+Na}]^+$.

5.2. Synthesis of $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5)\text{M}(\text{Biot-}q\text{-L})\text{Cl}]$

($\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5$ = pentamethylcyclopentadienyl, M= rhodium or iridium, q = *ortho*, *meta*, *para*).^[60] The dimer $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5)\text{MCl}_2]_2$ (38.8 μmol , 1.00 eq.), the biotinylated ligand **Biot- q -LH** (37.8 mg, 85.5 μmol , 2.20 eq.) and Et_3N (12.5 μL , 90 μmol , 2.25 eq.) were dissolved in isopropanol (2.0 mL), stirred at RT for 2 hours and then heated at 70 °C for 1 hour. The solvent was removed *in vacuo* to afford a red-brown to orange powder which was stored under nitrogen until use. For catalysis purposes, the crude catalyst precursor $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5)\text{M}(\text{Biot-}q\text{-L})\text{Cl}]$ was dissolved in degassed dimethylformamide to give a stock-solution with $[\text{M}] = 0.0395 \text{ M}$. This stock solution can be stored for several days at RT under nitrogen without any noticeable loss in activity or in selectivity.

The complexes were characterized by mass spectroscopy:

ESI-MS for $\text{RhC}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2\text{Cl}$: $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5)\text{Rh}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$: 442.1 (30) $[\text{LH}+\text{H}]^+$, 678.1 (100) $[\text{M-Cl}+\text{H}]^+$; $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5)\text{Rh}(\text{Biot-}m\text{-L})\text{Cl}]$: 736.1 (30) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 678.1 (100) $[\text{M-Cl}+\text{H}]^+$; $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5)\text{Rh}(\text{Biot-}o\text{-L})\text{Cl}]$: 700.1 (20) $[\text{M-Cl}+\text{Na}]^+$, 736.1 (20) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 678.1 (100) $[\text{M-Cl}+\text{H}]^+$.

ESI-MS for $\text{IrC}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2\text{Cl}$: $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5)\text{Ir}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$: 442.1 (10) $[\text{LH}+\text{H}]^+$, 768 (100) $[\text{M-Cl}+\text{H}]^+$; $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5)\text{Ir}(\text{Biot-}m\text{-L})\text{Cl}]$: 826.1 (10) $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$, 768.2 (100) $[\text{M-Cl}+\text{H}]^+$; $[\eta^5\text{-(C}_5\text{Me}_5)\text{Ir}(\text{Biot-}o\text{-L})\text{Cl}]$: 826.1 (20) $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$, 768.2 (40) $[\text{M-Cl}+\text{H}]^+$, 790 (100) $[\text{M-Cl}+\text{Na}]^+$.

5.3. General procedure for the synthesis of $[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{Biot-bipy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (7)

Reaction was carried out under an inert atmosphere using standard Schlenk techniques and degassed solvent. The synthesis of the complex $[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{Biot-bipy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$, SO_4^{2-} was a one-pot procedure adapted from the literature.^[61, 192]

A suspension of $[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6\text{)RuCl}_2]_2$ (97 mg, 0.145 mmol, 1 eq.) in water (16 mL) containing Ag_2SO_4 (92 mg, 0.295 mmol, 2.03 eq.) was protected from light and mixed during 2 hours. During this period the reaction glass was put in ultrasonic bath several times. Then, the precipitated silver salts were removed by filtration and the resulted yellow solution was added to the **Biot-bipy** ligand^[170] (153 mg, 0.29 mmol, 2 eq.). The reaction mixture was stirred over night and then evaporated to dryness under vacuum to afford a yellow-orange powder as the desired complex (7).

The complex was characterized by mass spectroscopy:

ESI-MS for $\text{RuC}_{38}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_6\text{S}$: $[\eta^6\text{-(C}_6\text{Me}_6\text{)Ru(Biot-bipy)H}_2\text{O}]^{2+}$: 803 (100) $[\text{M-H}_2\text{O}]^+$.

6. Experimental procedure for the catalytic asymmetric transfer hydrogenation

Methods. Streptavidin was produced, purified and quantified according to ref. ([183]). All experiments were carried out using standard Schlenk techniques, with thoroughly degassed solutions (nitrogen-flushed).

Boric Acid-Formate Mixture. Boric acid (2.63 g, 42.5 mmol) and sodium formate (3.4 g, 50 mmol) were dissolved in water (50 mL). The pH was adjusted to 6.25 with NaOH pellets and the solution was thoroughly degassed. The final stock-solution concentration was $\text{B(OH)}_3 = 0.85 \text{ M}$, $\text{HCO}_2\text{Na} = 1 \text{ M}$.

6.1. General Procedure for the Asymmetric Transfer Hydrogenation

Streptavidin was dissolved in water (100 μM tetrameric concentration stock-solution) and thoroughly degassed. The host protein was mixed in a test tube with the precursor complex $[\eta^6\text{-(arene)M(Biot-q-L)Cl}]$ and stirred at RT for 10 min. The boric acid-formate mixture and the MOPS buffer (1 M stock-solution, pH = 6.25) were added and

stirred for 10 min. Finally, the appropriate substrate or substrate cocktail was added. The test tube was placed in a magnetically stirred multireactor, purged several times with nitrogen, and heated at 55 °C for 40-64 hours.

After completion, the reaction mixture was extracted with Et₂O (4 × 1 mL, for 2-acetylpyridine 8 × 1 mL) and dried over Na₂SO₄. Subsequent continuous extraction of the resulting aqueous phase revealed no trace of substrate or product. The organic solution was filtered through a short silicagel plug that was thoroughly washed with Et₂O, concentrated and subjected to GC or HPLC analysis (2-acetylpyridine-containing extracts were not filtered on silicagel).

6.2. Detailed Protocol for the Asymmetric Transfer Hydrogenation with the Substrate Cocktail containing (8a), (8b) and (8c).

Conditions: Host protein (450 µL of the stock-solution, 0.045 µmol, 1.2 eq. active sites vs. metal), [η⁶-(arene)M(**Biot-q-L**)Cl] (3.8 µL of the dimethylformamide stock-solution, 0.15 µmol metal), boric acid·formate mixture (600 µL of the stock-solution, 120 eq. formate vs. each substrate), MOPS buffer (200 µL of a 1 M stock-solution in water, pH = 6.25), substrate cocktail containing (8a), (8b) and (8c) (15 µL stock-solution in dimethylformamide (0.11 M in each substrate), 1.65 µmol of each substrate, 11 eq. vs. metal), 55 °C, 40 hours.

6.3. Detailed Protocol for the Asymmetric Transfer Hydrogenation with the Substrate Cocktail containing (14) and (16) or the Substrate Cocktail containing (18) and (20).

Conditions : Host protein (450 µL of the stock-solution, 0.045 µmol, 1.2 eq. active sites vs. metal), [η⁶-(arene)M(**Biot-q-L**)Cl] (3.8 µL of the dimethylformamide stock-solution, 0.15 µmol metal), boric acid·formate mixture (600 µL of the stock-solution, 40 eq. formate vs. each substrate), MOPS buffer (200 µL of a 1 M stock-solution in water, pH = 6.25), substrate cocktail containing (14) and (16) or (18) and (20) (15 µL stock-solution

in dimethylformamide (0.5 M in each substrate), 7.5 μmol of each substrate, 50 eq. vs. metal), 55 $^{\circ}\text{C}$, 64 hours.

6.4. Detailed Protocol for the Asymmetric Transfer Hydrogenation with single substrates

Host protein (450 μL of the stock-solution, 0.045 μmol , 1.2 eq. active sites vs. metal), $[\eta^6\text{-(arene)M(Biot-}q\text{-L)Cl}]$ (3.8 μL of the dimethylformamide stock-solution, 0.15 μmol metal), boric acid-formate mixture (600 μL of the stock-solution, 40 eq. formate vs. substrate), MOPS buffer (200 μL of a 1 M stock-solution in water, pH = 6.25), substrate (8a-c), (12), (14), (16), (18) or (20) (15 μL of a 1 M stock-solution in dimethylformamide, 15 μmol , 100 eq. vs. metal), 55 $^{\circ}\text{C}$, 64 hours.

7. Analytical Data for the Reduction Products

For the mixture of the aromatic ketones (8a-c), the conversions and ee for the reduction products (9a-c) were determined by GC analysis on a β -Dex 120 capillary column (Supelco, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm , 100 kPa He) using the following program: 95/40/2.5/120/10/3/170/5/3.5/200/1[§]. The retention times for the alcohols are: 1-phenylethanol (9a), $t_{\text{R}} = 46.7$ min, $t_{\text{S}} = 48.7$ min; 1-(*p*-bromophenyl)ethanol (9b), $t_{\text{R}} = 78.1$ min, $t_{\text{S}} = 78.8$ min; 1-(*p*-methylphenyl)ethanol (9c), $t_{\text{R}} = 55.2$ min, $t_{\text{S}} = 58.0$ min. The absolute configurations of the enantiomers were assigned by comparison with published results (^[183]).

§ Program: initial temp. ($^{\circ}\text{C}$)/time (min)/slope ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)/temp. ($^{\circ}\text{C}$)/time (min)/slope ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)/temp. ($^{\circ}\text{C}$)/time (min)/slope ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)/ temp. ($^{\circ}\text{C}$)/time (min).

For the catalytic runs with single substrates, as well as for the other mixtures of substrates, the conversions and ee for the reduction products (9a-b), (13), (15), (17), (19) and (21) were determined by HPLC analysis on a Chiralcel OD-H column (Daicel

Chemical Industries, Tokyo), using hexane : isopropanol 100 : 2 at 0.9 mL/min. The retention times for the alcohols are:

7.1. 1-phenylethanol (9a)

1-phenylethanol (9a), $t_R = 18.4$ min, $t_S = 23.9$ min (UV detection at 215 nm, absolute configuration assigned by comparison with ref. (^[183])).

7.2. 1-(*p*-bromophenyl)ethanol (9b)

1-(*p*-bromophenyl)ethanol (9b), $t_R = 21.8$ min, $t_S = 19.3$ min (UV detection at 225 nm, absolute configuration assigned by comparison with ref. (^[183])).

7.3. 1-(*p*-methylphenyl)ethanol (9c)

The conversions and ee for 1-(*p*-methylphenyl)ethanol (9c) were determined by HPLC analysis on a (S,S)-ULMO column (Regis Technologies Inc., Illinois, U.S.A.) using hexane : 1,2-dimethoxyethane 100 : 1.5 at 1mL/min.⁷ The retention times for the enantiomers are: $t_R = 16.6$ min, $t_S = 19.5$ min (UV detection at 215 nm, absolute configuration assigned by comparison with ref. (^[193])).

7.4. 1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthol (13)

1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthol (13), $t_R = 18.5$ min, $t_S = 17.2$ min (UV detection at 215 nm, absolute configuration assigned by comparison with a commercial enantiopure sample).

7.5. α -Methyl-2-pyridinemethanol (15)

α -Methyl-2-pyridinemethanol (15), $t_R = 19.5$ min, $t_S = 22.2$ min (UV detection at 260 nm, absolute configuration assigned by comparison with a commercial enantiopure sample).

7.6. 1-Phenyl-2-butanol (17)

1-Phenyl-2-butanol (17), $t_R = 16.6$ min, $t_S = 11.2$ min (UV detection at 215 nm, absolute configuration assigned by comparison with ref. (^[194])).

7.7. 4-Phenyl-2-butanol (19)

4-Phenyl-2-butanol (19), $t_R = 25.3$ min, $t_S = 43.1$ min (UV detection at 215 nm, absolute configuration assigned by comparison with a commercial enantiopure sample).

7.8. 4-Benzyloxy-2-butanol (21)

4-Benzyloxy-2-butanol (21), $t_R = 23$ min, $t_S = 18$ min (UV detection at 215 nm, absolute configuration assigned by comparison with an enantiopure sample prepared from (*R*)-1,3-butanediol).

8. Docking procedure using Autodock 3.0.5

The implemented Lamarckian genetic algorithm (LGA) was used as search engine. The grid size used for all dockings was set to 80 x 80 x 80 points with a 0.375 Å grid space, centered on the mass of biotin in the crystal structure of biotin $\subset$ Sav Wt (of subunit A). Step sizes of 1 Å for translation and 50° for rotation were chosen, the maximum number of

energy evaluations was set to 250'000. For each run, a maximum number of 27'000 LGA operations were generated on a single population of 50 individuals. The Ru(II) parameters were replaced by Zn(II) ones, using the implemented AMBER force field.

9. Références bibliographiques

- [1] D. Astruc, *Chimie Organométallique*, EDP Sciences, Grenoble, **2000**.
- [2] R. Noyori, *Asymmetric Catalysis in organic Synthesis*, Wiley-Interscience ed., Wiley-Interscience, New York, **1994**.
- [3] G. N. Schrauzer, R. J. Holland, J. A. Seck, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 1503.
- [4] E. N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto, *Comprehensive Asymmetric Catalysis*, Springer, Berlin, **1999**.
- [5] I. Ojima, *Catalytic Asymmetric Synthesis*, Wiley-VCH ed., Wiley-VCH, New York, **2000**.
- [6] R. R. Schrock, G. W. Parshall, *Chem. Rev.* **1976**, 76, 243.
- [7] L. Vaska, *Acc. Chem. Res.* **1976**, 9, 175.
- [8] J. A. Osborn, F. S. Jardine, J. F. Young, G. Wilkinson, *J. Chem. Soc.* **1966**, 1711.
- [9] H. B. Kagan, *L'actualité chimique* **2003**, 10.
- [10] S. C. Stinson, *Chem. Engineering news* **2001**, 79, 79.
- [11] A. M. Thayer, *Chem. Engineering news* **2005**, 83, 40.
- [12] H. U. Blaser, *Chem. Commun.* **2003**, 293.
- [13] T. P. Dang, H. B. Kagan, *J. Chem. Soc. Commun* **1971**, 481.
- [14] H. B. Kagan, T. P. Dang, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6429.
- [15] W. S. Knowles, M. J. Sabacky, B. D. Vineyard, D. J. Weinkauff, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 2567.
- [16] K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2024.
- [17] T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5974.
- [18] Y. Gao, R. M. Hanson, J. M. Klunder, S. Y. Ko, H. Masamune, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5765.
- [19] W. S. Knowles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1998.
- [20] R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2008.
- [21] A. Miyashita, A. Yasuda, H. Takada, K. Toriumi, T. Ito, T. Souchi, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 7932.

- [22] H. U. Blaser, C. Malan, B. Pugin, F. Spindler, H. Steiner, M. Studer, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 103.
- [23] R. Noyori, T. Ohkuma, *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, 40, 40.
- [24] D. A. Alonso, D. Guijarro, P. Pinho, O. Temme, P. G. Andersson, *J Org Chem* **1998**, 63, 2749.
- [25] A. Gayet, C. Bolea, P. G. Andersson, *Org Biomol Chem* **2004**, 2, 1887.
- [26] D. Xiao, Z. Zhang, X. Zhang, *Org Lett* **1999**, 1, 1679.
- [27] C. R. Landis, J. Halpern, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 1746.
- [28] H. Brunner, A. Winter, J. Breu, *J. Organomet. Chem.* **1998**, 553, 285.
- [29] W. S. Knowles, *Acc. Chem. Res.* **1983**, 16, 106.
- [30] I. D. Gridnev, T. Imamoto, *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 633.
- [31] E. M. Vogl, H. Gröger, M. Shibasaki, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1570.
- [32] S. P. Smidt, N. Zimmermann, M. Studer, A. Pfaltz, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 4685.
- [33] U. Burckhardt, M. Baumann, A. Togni, *Tetrahedron Asym.* **1997**, 8, 155.
- [34] S. Arseniyadis, P. V. Subhash, A. Valleix, S. P. Mathew, D. G. Blackmond, A. Wagner, C. Mioskowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6138.
- [35] D. A. Beauchamp, S. J. Loeb, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 5084.
- [36] B. Jandeleit, D. J. Schaefer, T. S. Powers, H. W. Turner, W. H. Weinberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2494.
- [37] M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 284.
- [38] P. F. Hughes, T. H. Graham, J. S. Mendoza, *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 308.
- [39] F. Taran, C. Gauchet, B. Mohar, S. Meunier, A. Valleix, P. Y. Renard, C. Créminon, J. Grassi, A. Wagner, C. Mioskowski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 124.
- [40] S. R. Gilbertson, X. Wang, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6475.
- [41] C. Gennari, U. Piarulli, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3071.
- [42] 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.
- [43] T. Ohkuma, M. Koizumi, M. Yoshida, R. Noyori, *Org Lett* **2000**, 2, 1749.
- [44] T. Ohkuma, T. Hattori, H. Ooka, T. Inoue, R. Noyori, *Organic Letters* **2004**, 6, 2681.

- [45] C. A. Sandoval, T. Ohkuma, K. Muniz, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13490.
- [46] T. Ohkuma, M. Koizumi, K. Muniz, G. Hilt, C. Kabuto, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6508.
- [47] S. E. Clapham, A. Hadzovic, R. H. Morris, *Coordination Chemistry Reviews* **2004**, *248*, 2201.
- [48] R. Hartmann, P. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3581.
- [49] M. J. Palmer, M. Wills, *Tetrahedron Asym.* **1999**, *10*, 2045.
- [50] H. Adkins, R. M. Eloffson, A. G. Rossow, C. C. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 3622.
- [51] H. Junge, M. Beller, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1031.
- [52] K. Wagner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1970**, *9*, 50.
- [53] R. Noyori, S. Hashiguchi, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 97.
- [54] R. Noyori, M. Yamakawa, S. Hashiguchi, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7931.
- [55] C. F. de Graauw, J. A. Peters, H. van Bekkum, J. Huskens, *Synthesis* **1994**, 1007.
- [56] W. N. Moulton, R. E. Van Atta, R. R. Ruch, *J. Org. Chem.* **1960**, *26*, 290.
- [57] V. J. Shiner, D. Whittaker, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 394.
- [58] D. A. Alonso, P. Brandt, S. J. M. Nordin, P. G. Andersson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9580.
- [59] K.-J. Haack, S. Hashiguchi, A. Fujii, T. Ikariya, R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 285.
- [60] K. Murata, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2186.
- [61] S. Ogo, T. Abura, Y. Watanabe, *Organometallics* **2002**, *21*, 2964.
- [62] S. J. Nordin, P. Roth, T. Tarnai, D. A. Alonso, P. Brandt, P. G. Andersson, *Chemistry* **2001**, *7*, 1431.
- [63] K. Mashima, T. Abe, K. Tani, *Chem. Lett.* **1998**, 1201.
- [64] A. Fujii, S. Hashiguchi, N. Uematsu, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2521.
- [65] M. Yamakawa, I. Yamada, R. Noyori, *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*, 2818.
- [66] A. Hayes, G. Clarkson, M. Wills, *Tetrahedron Asym.* **2004**, *15*, 2079.
- [67] X. Wu, X. Li, W. Hems, F. King, J. Xiao, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1818.
- [68] R. Noyori, M. Yamakawa, S. Hashiguchi, *J Org Chem* **2001**, *66*, 7931.

- [69] M. Yamakawa, H. Ito, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1466.
- [70] M. J. Palmer, J. A. Kenny, T. Walsgrove, A. M. Kawamoto, M. Wills, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 416.
- [71] K. Everaere, A. Mortreux, J.-F. Carpentier, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 67.
- [72] X. Sun, G. Manos, J. Blacker, J. Martin, A. Gavriilidis, *Organic Process Research & Development* **2004**, 8, 909.
- [73] S. J. M. Nordin, P. Roth, T. Tarnai, D. A. Alonso, P. Brandt, P. G. Andersson, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 1431.
- [74] T. Abura, S. Ogo, Y. Watanabe, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4149.
- [75] J.-X. Gao, P.-P. Xu, X.-D. Yi, C.-B. Yang, H. Zhang, S.-H. Cheng, H.-L. Wan, K.-R. Tsai, T. Ikariya, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **1999**, 147, 105.
- [76] J.-X. Gao, T. Ikariya, R. Noyori, *Organometallics* **1996**, 15, 1087.
- [77] A. M. Maj, K. M. Pietrusiewicz, I. Suisse, F. Agbossou, A. Mortreux, *Tetrahedron Asym.* **1999**, 10, 831.
- [78] Y. Himeda, N. Onozawa-Komatsuzaki, H. Sugihara, H. Arakawa, K. Kasuga, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2003**, 195, 95.
- [79] T. Sammakia, E. L. Stangeland, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6104.
- [80] T. Ohta, S.-I. Nakahara, Y. Shigemura, K. Hattori, I. Furukawa, *Appl. Organometal. Chem.* **2001**, 15, 699.
- [81] Á. Kathó, D. Carmona, F. Viguri, C. D. Remacha, J. Kovács, F. Joó, L. A. Oro, *J. Organomet. Chem.* **2000**, 593, 299.
- [82] I. M. Pastor, P. Vastila, H. Adolfsson, *Chem. Commun.* **2002**, 2046.
- [83] I. M. Pastor, P. Västilä, H. Adolfsson, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4031.
- [84] A. Lavoie, J. W. Faller, *Organometallics* **2001**, 20, 5245.
- [85] H. Y. Rhyoo, H. J. Park, Y. K. Chung, *Chem Commun (Camb)* **2001**, 2064.
- [86] M. T. Reetz, X. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1044.
- [87] X. Li, X. Wu, W. Chen, F. E. Hancock, F. King, J. Xiao, *Org. Lett.* **2004**, 6, 3321.
- [88] X. Wu, X. Li, F. King, J. Xiao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3407.
- [89] P.-N. Liu, P.-M. Gu, J.-G. Deng, Y.-Q. Tu, Y.-P. Ma, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3221.
- [90] I. Kawasaki, K. Tsunoda, T. Tsuji, T. Yamaguchi, H. Shibuta, N. Uchida, M. Yamashita, S. Ohta, *Chem. Commun.* **2005**, 2134–2136.

- [91] Y. Ma, H. Liu, L. Chen, X. Cui, J. Zhu, J. Deng, *Org. Lett.* **2003**, 5, 2103.
- [92] T. Thorpe, J. Blacker, S. M. Brown, C. Bubert, J. Crosby, S. Fitzjohn, J. P. Muxworthy, J. M. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 4041.
- [93] Y. Caro, M. Torrado, C. F. Masaguer, E. Raviña, *Tetrahedron Asym.* **2003**, 14, 3689.
- [94] S. Hashiguchi, A. Fujii, K.-J. Haack, K. Matsumura, T. Ikariya, R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 288.
- [95] J. Paetzold, J. E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17620.
- [96] S. Yamada, T. Misono, Y. Iwai, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 2239.
- [97] G. Csjermyik, K. Bogár, J.-E. Bäckvall, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 6799.
- [98] D. E. Metzler, *BIOCHEMISTRY The Chemical Reactions of Living Cells*, New York, **1997**.
- [99] L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Compagniy ed., W. H. Freeman, New York, **1995**.
- [100] D. E. Benson, M. S. Wisz, H. W. Hellinga, *Cur. Opin. Biotechnol.* **1998**, 9, 370.
- [101] K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Nature* **2001**, 409, 232.
- [102] K. Nakamura, R. Yamanaka, T. Matsuda, T. Harada, *Tetrahedron Asym.* **2003**, 14, 2659.
- [103] C. M. Thomas, T. R. Ward, *Appl. Organometal. Chem.* **2005**, 19, 35.
- [104] C. M. Thomas, T. R. Ward, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 337.
- [105] K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. del Cardayré, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. H. Huisman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3948.
- [106] A. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Cur. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 548.
- [107] G. DeSantis, Z. Zhu, W. A. Greenberg, 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.
- [108] A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron Asym.* **2004**, 15, 3331.
- [109] M. Edin, J.-E. Bäckvall, A. Córdova, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7697.
- [110] H. Gröger, W. Hummel, C. Rollmann, F. Chamouleau, H. Hüsken, H. Werner, C. Wunderlich, K. Abokitse, K. Drauz, S. Buchholz, *Tetrahedron* **2004**, 60, 633.
- [111] J. M. Vrtis, A. K. White, W. W. Metcalf, W. A. van der Donk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3257.

- [112] W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014.
- [113] M. J. Homman, R. B. Vail, E. Previte, M. Tamarez, B. Morgan, D. R. Dodds, A. Zaks, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 789.
- [114] K. Li, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10545.
- [115] H. Joo, A. Arisawa, Z. Lin, F. H. Arnold, *Chemistry & Biology* **1999**, *6*, 699.
- [116] M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, *101*, 5716.
- [117] T. D. H. Bugg, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 465.
- [118] N. Humbert, *Thèse de doctorat*, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, **2005**.
- [119] R. Chen, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 13.
- [120] M. T. Reetz, L.-W. Wang, M. Bocola, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1236.
- [121] O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *18*, 317.
- [122] K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 709.
- [123] N. J. Turner, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 474.
- [124] R. Krämer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *45*, 858.
- [125] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4872.
- [126] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 1.
- [127] F. Tanaka, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4885.
- [128] X. Zhang, K. N. Houk, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 379.
- [129] P. G. Schultz, J. Yin, R. A. Lerner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4427.
- [130] P. G. Schultz, *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 287.
- [131] P. Wentworth, K. D. Janda, *Cur. Opin. Chem. Bio.* **1998**, *2*, 138.
- [132] P. A. Patten, N. S. Gray, P. L. Yang, C. B. Marks, G. J. Wedemayer, J. J. Boniface, R. C. Stevens, P. G. Schultz, *Science* **1996**, *271*, 1086.
- [133] A. G. Cochran, T. Pham, R. Sugawara, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6670.
- [134] M. R. Tremblay, T. J. Dickerson, K. D. Janda, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 577.
- [135] K. D. Janda, M. I. Weinhaus, D. M. Schloeder, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1274.
- [136] P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 391.

- [137] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science* **1984**, 226, 505.
- [138] D. Qi, C.-M. Tann, D. Haring, M. D. Distefano, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3081.
- [139] R. R. Davies, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11643.
- [140] Y. Lu, *Cur. Opin. Chem. Bio.* **2005**, 9, 118.
- [141] C. A. Kruithof, M. A. Casado, G. Guillena, M. R. Egmond, A. Van der Kerk-van Hoof, A. J. R. Heck, R. J. M. Klein Gebbink, G. Van Koten, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 6869.
- [142] 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.
- [143] M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2002**, 58, 6595.
- [144] 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.
- [145] B. G. Davis, *Cur. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 1.
- [146] T. Ueno, M. Ohashi, M. Kono, K. Kondo, A. Suzuki, T. Yamane, Y. Watanabe, *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 2852.
- [147] H. Sato, T. Hayashi, T. Ando, Y. Hisaeda, T. Ueno, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 126, 436.
- [148] M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1005.
- [149] T. Ueno, T. Koshiyama, M. Ohashi, K. Kondo, M. Kono, A. Suzuki, T. Yamane, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6556.
- [150] A. Mahammed, Z. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2883.
- [151] M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 306.
- [152] C.-C. Lin, C.-W. Lin, A. S. C. Chan, *Tetrahedron Asym.* **1999**, 10, 1887.
- [153] T. R. Ward, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 3798.
- [154] G. Klein, N. Humbert, J. Gradinaru, A. Ivanova, F. Gilardoni, U. E. Rusbandi, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7764.
- [155] J. Collot, J. Gradinaru, N. Humbert, M. Skander, A. Zocchi, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9030.
- [156] 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.
- [157] M. Skander, C. Malan, A. Ivanova, T. R. Ward, *Chem. Commun.* **2005**, 4815.

- [158] N. M. Green, *Adv. Protein Chem.* **1975**, 29, 85.
- [159] Y. Eisenberg-Domovich, Y. Pazy, O. Nir, B. Raboy, E. A. Bayer, M. Wilchek, O. Livnah, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, 101, 5916.
- [160] L. Chaiet, F. J. Wolf, *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, 106, 1.
- [161] P. Gyorgy, C. S. Rose, K. Hofmann, D. B. Melville, V. Du Vigneau, *Science* **1940**, 92, 609.
- [162] O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1993**, 90, 5076.
- [163] P. C. Weber, J. J. Wendoloski, M. W. Pantoliano, F. R. Salemme, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3197.
- [164] A. T. Marttila, O. H. Laitinen, K. J. Airene, T. Kulik, E. A. Bayer, M. Wilchek, M. S. Kulomaa, *FEBS Lett.* **2000**, 467, 31.
- [165] Y. Pazy, T. Kulik, E. A. Bayer, M. Wilchek, O. Livnah, *J. Biol. Chem.* **2002**, 227, 30892.
- [166] S. Freitag, I. Le Trong, L. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, *Protein Sci.* **1997**, 6, 1157.
- [167] N. M. Green, *Biochem. J.* **1966**, 101, 774.
- [168] D. E. Hyre, I. Le Trong, E. A. Merritt, J. F. Eccleston, N. M. Green, R. E. Stenkamp, P. S. Stayton, *Protein Sci.* **2006**, 15, Early view.
- [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] A. Loosli, *Thèse de doctorat*, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, **2004**.
- [171] N. Humbert, A. Zocchi, T. R. Ward, *Electrophoresis* **2005**, 26, 47.
- [172] A. S. Mildvan, *Biochemistry* **2004**, 43, 14517.
- [173] K. L. Morley, R. J. Kaslauskas, *Trends Biotechnol.* **2005**, 23, 231.
- [174] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comp. Chem.* **1998**, 19, 1639.
- [175] D. S. Goodsell, G. M. Morris, A. J. Olson, *J. Mol. Recogn.* **1996**, 9, 1.
- [176] N. Uematsu, A. Fujii, S. Hashiguchi, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4916.
- [177] K. D. Shimizu, N. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1885.
- [178] D. Wahler, F. Badalassi, P. Crotti, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 3211.

- [179] *Calculé d'après l'équation de Curtin - Hammett : $RT \cdot \ln ([R] / [S]) = \delta \Delta G$.*
- [180] *2-acétylpyridine: $pK_a = 2.68$ à 25°C . Calculated using advanced chemistry development (ACD / Labs) software V8.14 for Solaris.*
- [181] K. Polborn, K. Severin, *Chem. Commun.* **1999**, 2481.
- [182] I. Le Trong, N. Humbert, T. R. Ward, R. E. Stenkamp, *J. Mol. Biol.* **2006**, 356, 738.
- [183] C. Letondor, N. Humbert, T. R. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, 102, 4683.
- [184] C. M. Thomas, C. Letondor, N. Humbert, T. R. Ward, *J. Organomet. Chem.* **2005**, 690, 4488.
- [185] C. Letondor, A. Pordea, N. Humbert, A. Ivanova, S. Mazurek, M. Novic, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *in Press*.
- [186] D. M. Kneeland, K. Ariga, V. M. Lynch, C.-Y. Huang, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 10042.
- [187] C. E. Garrett, X. Jiang, K. Prasad, O. Repic, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4161.
- [188] C. Somlai, M. Berényi, P. Z. Maroy, *Naturforsch* **1993**, 48b, 511.
- [189] G. Pandey, T. D. Bagul, A. K. Sahoo, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 760.
- [190] M. A. Bennett, T. N. Huang, T. W. Matheson, A. K. Smith, *Inorg. Chem.* **1982**, 21, 74.
- [191] M. A. Bennett, A. K. Smith, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1974**, 233.
- [192] M. Jahncke, M. Meister, G. Rheinwald, J. Stoeckli-Evans, G. Süss-Fink, *Organometallics* **1997**, 16, 1137.
- [193] G. Uray, W. Stampfer, W. M. F. Fabian, *J. Chrom. A* **2003**, 992, 151.
- [194] A. Uzura, T. Katsuragi, Y. Tani, *J. BioSci. Bioeng.* **2001**, 92, 381.

10. Annexes : figures supplémentaires

Catalyse réalisées sans précaution O₂ à 55° C durant 64 heures avec le catalyseur $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}] \subset \text{P64G}$.

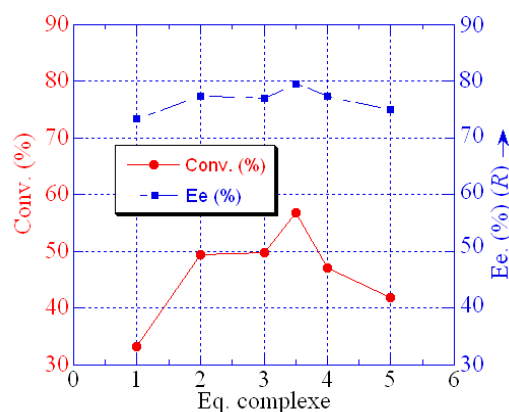


Figure IV. 10.1 : Evolution de la conversion et de la sélectivité en fonction du nombre d'équivalents de complexe par rapport au nombre de site actifs.

Avec un équivalent de complexe la conversion et la sélectivité sont moins bonnes. De 2 à 4 équivalents la conversion et la sélectivité varient peu avec un maximum atteint avec 3.5 équivalents de complexe. À partir du cinquième équivalent la sélectivité et la conversion baisse légèrement. Dans ces conditions la réaction semble plus rapide pour un complexe ancré dans la protéine.

Dichroïsme circulaire pour le complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}] \subset \text{P64G}$.

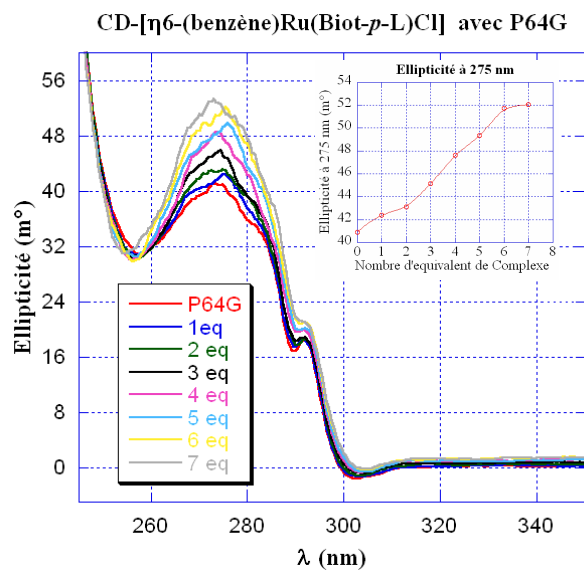


Figure IV. 10.2 : Spectre CD du complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}] \subset \text{P64G}$ Expérience réalisée à 45°C en présence de source d'hydrures HCOONa – acide borique et MOPS (condition de catalyse). L'évolution de l'ellipticité à 275 nm en fonction du nombre d'équivalent de complexe est présentée dans l'encart.

Spectres UV – visible réalisés avec les complexes $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ et $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$.

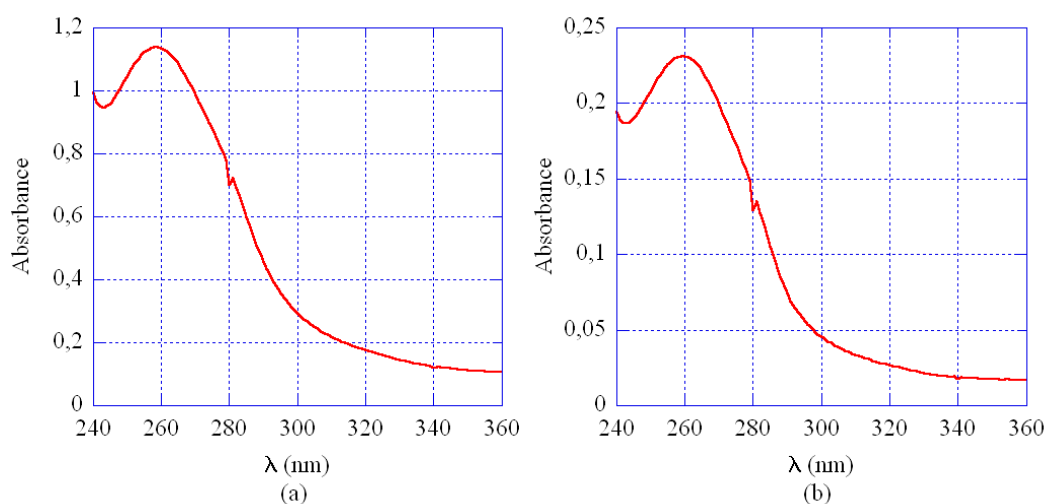


Figure IV. 10.3: Spectre UV – visible a) Complexe $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ b) Complexe $[\eta^6\text{-(benzène)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$.