

**Métalloenzymes artificielles pour l'hydrogénation énantiosélective
basées sur la technologie biotine-avidine**

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

Jérôme Collot

Chimiste diplômé de l'Université d'Orsay (France)

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Métalloenzymes artificielles pour
l'hydrogénation énantiosélective basées
sur la technologie biotine-avidine**

M. Jérôme COLLOT

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

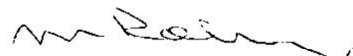
La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel, sur le rapport des membres du jury

MM. T. Ward (directeur de thèse), R. Neier et
S. Jugé (Dijon F)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 1^{er} juin 2004

La doyenne:



Martine Rahier

Le travail présenté dans cet ouvrage a été réalisé d'avril 2000 à mai 2004 au sein du laboratoire de Métalloenzymes Artificielles de l'Université de Neuchâtel, sous la direction du Professeur Thomas R. Ward. Je tiens à le remercier pour la confiance qu'il m'a accordée dans la conduite de ce travail ainsi que de sa disponibilité et pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eu pendant ces 4 années de thèse.

Je remercie le professeur Sylvain Jugé de l'Université de Dijon et le professeur Reinhard Neier de l'Université de Neuchâtel, membres du jury de thèse, pour avoir pris le temps de lire ce manuscrit et de juger mon travail.

J'adresse également mes remerciements sincères à toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce projet. En particulier:

Nicolas Humbert, Andrea Zocchi, Julieta Gradinaru, Myriem Skander, Andreas Loosli, Jérôme Sauser et Edy Rusbandi pour leur précieuse collaboration à ce travail.

Je remercie également les autres membres du groupe, collègues et amis, avec qui j'ai eu le plaisir de partager ces 4 années de thèse.

Merci enfin à ma famille pour leur amour et leur soutien.

Résumé	1
Summary	2
Abréviations	3
Chapitre I: Introduction	6
I.1. La catalyse asymétrique	7
I.1.2. Généralités	7
I.1.3. Les limites de l'utilisation de catalyseurs dans l'industrie	15
I.2. La catalyse enzymatique: Généralités	16
I.3. Comparaisons entre la catalyse homogène et la catalyse enzymatique	19
I.4. Elaboration de métalloenzymes artificielles	20
I.4.1. Incorporation covalente de complexes organométalliques dans une protéine	20
I.4.2. Incorporation non covalente de complexes organométalliques dans une protéine	24
I.4.2.1. Le système biotine–(strept)avidine	24
I.4.2.1.1. L'affinité de la biotine pour la (strept)avidine: Rationalisation	26
I.4.2.1.2. Les applications de la technologie biotine–(strept)avidine dans la domaine de la biotechnologie	31
I.4.2.1.3. Les applications de la technologie biotine–(strept)avidine dans la domaine de la catalyse	33
I.5. Objectifs du travail de thèse	34
Chapitre II: Résultats et discussion	36
II.1. Introduction	37
II.2. Préparation de ligands aminodiphosphines biotinylés	37
II.2.1. Préparation du ligand Biot–1 sans espaceur	37
II.2.2. Tentatives de préparation de ligands diphosphines	38
II.2.2.1. À partir du sérinol	39
II.2.2.2. À partir de l'épichlorohydrine	45
II.2.3. Préparation du ligand Biot–2 sans espaceur	51

II.2.4.	Préparation des ligands avec espaceurs	53
II.2.4.1.	Préparation des précurseurs acides aminés biotinylés	54
II.2.4.2.	Technique de couplage entre les précurseurs acides aminés biotinylés et l'aminodiphosphine (H-1 ou H-2)	56
II.2.4.2.1.	Préparation des ligands de type Biot-3ⁿ-1 avec espaceurs aliphatiques 3ⁿ (n = 1-7)	57
II.2.4.2.2.	Préparation des ligands de type Biot-4^q-1 avec espaceurs aromatiques 4^q (q = <i>ortho</i> -, <i>mé</i> ta-, <i>para</i> -)	58
II.2.4.2.3.	Préparation des ligands de type Biot-3ⁿ-2 avec espaceurs aliphatiques 3ⁿ (n = 1-7)	63
II.2.4.2.4.	Préparation des ligands de type Biot-4^q-2 avec espaceurs aromatiques 4^q (q = <i>ortho</i> -, <i>mé</i> ta-, <i>para</i> -)	64
II.3.	Etude de l'hydrogénation énantiosélective de l'acide \square -acétamidoacrylique par des métalloenzymes artificielles	65
II.3.1.	Préambule	65
II.3.1.1.	Le principe de quantification de la protéine: Le cas de l'avidine	65
II.3.1.2.	Le procédé d'hydrogénation	69
II.3.1.2.1.	La méthode de dégazage des solutions	69
II.3.1.2.2.	Le système d'hydrogénation	69
II.3.1.2.3.	Les extractions	71
II.3.1.2.4.	L'analyse des échantillons	73
II.3.2.	Hydrogénation asymétrique de l'acide \square -acétamidoacrylique catalysée par le complexe [Rh(Biot-1)(COD)]BF ₄ dans l'avidine	74
II.3.2.1.	Les résultats de la catalyse	74
II.3.3.	Hydrogénation asymétrique de l'acide \square -acétamidoacrylique catalysée par le complexe [Rh(Biot-1)(COD)]BF ₄ dans la streptavidine	77
II.3.3.1.	Les résultats de la catalyse	77
II.3.3.2.	Influence du pourcentage de complexe [Rh(Biot-1)(COD)]BF ₄ sur la catalyse	81
II.3.3.3.	Catalyse réalisée en milieu deutéré	83
II.3.3.4.	Effet de la pression d'hydrogène sur la catalyse	87
II.3.3.5.	Le comportement des sites actifs	89

II.3.3.6.	Etude de l'accélération de la catalyse dans l'avidine et la streptavidine avec le complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$	91
II.3.4.	Modification chimique de la première sphère de coordination	96
II.3.4.1.	Effet des ligands biotinylés $\mathbf{Biot-1}$, $\mathbf{Biot-3^a-1}$ et $\mathbf{Biot-4^a-1}$ sur l'énantiosélectivité de la réaction	96
II.3.4.2.	Effet des ligands biotinylés $\mathbf{Biot-2}$, $\mathbf{Biot-3^a-2}$ et $\mathbf{Biot-4^a-2}$ sur l'énantiosélectivité de la réaction	100
II.3.5.	Modification génétique de la seconde sphère de coordination	106
II.3.5.1.	Modification du point isoélectrique de l'avidine	106
II.3.5.2.	Modification de la flexibilité de la boucle L 7,8 de la streptavidine	109
	Chapitre III: Conclusion	112
III.	Conclusions et perspectives	113
	Chapitre IV: Partie expérimentale	117
	Chapitre V: Références	154

Résumé

Dans le domaine de la catalyse énantiosélective, la seconde sphère de coordination (solvant, contre-ions, etc...) influence fortement les propriétés du catalyseur. En exploitant les faibles interactions qui régissent la seconde sphère de coordination, nous avons incorporé un catalyseur précurseur achiral dans une protéine, offrant ainsi un environnement chiral bien défini autour du catalyseur. Au lieu d'incorporer de façon covalente le complexe organométallique dans la protéine, nous avons exploité la technologie biotine-avidine afin de l'introduire de façon supramoléculaire. Ces métalloenzymes artificielles ont été testées sur l'hydrogénation énantiosélective de l'acide α -acétamidoacrylique.

Afin d'optimiser l'énantiosélectivité de la réduction de l'acide α -acétamidoacrylique, deux stratégies complémentaires ont été menées: la modification chimique de la première sphère de coordination du catalyseur biotinylé et la modification génétique de la seconde sphère de coordination. Nos efforts se sont principalement orientés sur l'incorporation d'espaceurs acides aminés entre la biotine et le groupement amino-diphosphine. Le but était de sonder la topographie de la cavité de la protéine et de trouver un environnement chiral favorable. Deux différents chélates ont été testés lors de cette étude. Pour la procédure d'optimisation génétique, l'avidine et la streptavidine ont subi des mutagénèses dirigées. Les catalyseurs hybrides bio-organométalliques ainsi obtenus possèdent des propriétés très prometteuses (ee 96%). D'autres expériences ont également été réalisées avec ces métalloenzymes artificielles comme l'influence de la pression d'hydrogène sur l'énantiosélectivité, l'étude de l'accélération de la catalyse dans la protéine, etc...

Summary

In the field of enantioselective catalysis, the second coordination sphere (solvent, counter ion, etc.) often dramatically influences the properties of a catalyst. To take advantage of the weak interactions which govern second coordination sphere, we incorporated an achiral catalyst precursor into a protein, thus offering a well-defined chiral environment around the catalyst. Rather than covalently anchoring the organometallic complex to the protein, we exploit the biotin-avidin technology to introduce the catalyst by supramolecular way into the host protein. These artificial metalloenzymes have been tested on the enantioselective hydrogenation of \square -acetamidoacrylic acid.

In order to optimize the enantioselectivity of the reduction of \square -acetamidoacrylic acid, two complementary strategies have been pursued: chemical modification of the first coordination sphere of the biotinylated catalyst and genetic modification of the second coordination sphere. Our efforts have focused primarily on the introduction of an aminoacid spacer between biotin and the aminodiphosphine. This allows to probe the topography of the host protein's binding pocket in search of a favourable chiral environment. Two different amino-diphosphine chelate were tested in this study. For the genetic optimization procedure, avidin and streptavidin were subjected to site-directed mutagenesis. The resulting hybrid bio-organometallic catalysts display very promising properties (ee 96%). Other experiments were performed with these artificial metalloenzymes such as: influence of hydrogen pressure on the enantioselectivity, studies of protein-accelerated catalysis, etc...

Liste des abréviations

Å	Angström
ADN	Acide désoxyribonucléique
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
BuLi	Butyllithium
cal	Calorie
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CH ₃ CN	Acétonitrile
CH ₃ SO ₂ Cl	Chlorure de méthanesulfonyle
COD	1,5-Cyclooctadiène
Conv.	Conversion
CuCl ₂	Chlorure de cuivre (II)
DACA	4-Diméthylaminocinnamaldéhyde
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DET	Diéthyltartrate
DHQ	Dihydroquinine
DHQD	Dihydroquinidine
DIAD	Diisopropylazodicarbonate
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPA	Azoture de diphénylphosphoryle
ee	Excès énantiomérique
Equiv.	Equivalent

Abréviations

Et ₂ NH	Diéthylamine
Et ₃ N	Triéthylamine
EtOH	Ethanol
g	Gramme
GC	Chromatographie en phase gazeuse
h	Heure
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorydrique
HPPPh ₂	Diphénylphosphine
Hz	Hertz
LiAlH ₄	Hydruure de lithium aluminium
LiPPPh ₂	Diphénylphosphure de lithium
KPPPh ₂	Diphénylphosphure de potassium
M	Molaire
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
min.	Minute
mL	Millilitre
MOPS	Acide 3-(<i>N</i> -morpholino)propanesulfonique
Na ₂ CO ₃	Carbonate de di-sodium
Na ₂ HPO ₄	Hydrogénocarbonate de di-sodium
NaH	Hydruure de sodium
NBD	Norbornadiène
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide

Abréviations

NMM	4- <i>N</i> -Méthylmorpholine
OMs	Mésylate
OsO ₄	Tétra-oxyde d'osmium
PHAL	Phtalazine
PPh ₃	triphénylphosphine
ppm	Partie par million
Rdt	Rendement
R _f	Facteur de rétention
SiO ₂	Silice
S _N 2	Substitution nucléophile d'ordre 2
SOCl ₂	Chlorure de thionyle
T	Température
t	Temps
t.a.	Température ambiante
tBuOH	Tert-butoxyde de potassium
tBuOOH	Hydropéroxyde de tertiobutyle
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
Ti(OiPr) ₄	Tétraisopropoxyde de titanium
t _r	Temps de rétention
ZnBr ₂	Bromure de zinc

CHAPITRE I: INTRODUCTION

I.1. La catalyse asymétrique

I.1.2. Généralités

La chiralité moléculaire se rencontre fréquemment en chimie organique. Les activités biologiques des médicaments, parfums, additifs alimentaires sont étroitement liées à la configuration absolue des molécules impliquées. Un des exemples les plus marquants de l'importante relation qui existe entre l'industrie pharmaceutique et la chiralité moléculaire est la tragique administration de la thalidomide sous sa forme racémique aux femmes enceintes dans les années 1960. La (*R*)-thalidomide possède des propriétés désirables de sédatifs alors que son énantiomère (*S*) est tératogène et provoque des malformations du fœtus¹.

Ces 40 dernières années, la catalyse asymétrique effectuée par des métaux de transition a connu un essor considérable. Les efforts réalisés dans ce domaine ont été récompensés par un prix Nobel attribué conjointement à W.S. Knowles², R. Noyori³ et K. B. Sharpless⁴ en 2001. Leurs travaux représentent une avancée spectaculaire dans le domaine de la catalyse asymétrique. En 1966, Wilkinson élaborait un complexe chlorotris(triphénylphosphine)rhodium, $[\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3]$, permettant l'hydrogénation homogène des alcènes. Il démontra ainsi la possibilité d'activer l'hydrogène moléculaire par un composé organométallique⁵. Knowles fut un des précurseurs de l'hydrogénation asymétrique lorsqu'il décida de substituer les ligands triphénylphosphines du complexe de Wilkinson par des phosphines chirales où la chiralité était portée sur l'atome de phosphore². La première réaction d'hydrogénation asymétrique d'une oléfine avec ce type de ligand a été réalisée sur l'acide α -phénylacrylique (Figure 1).

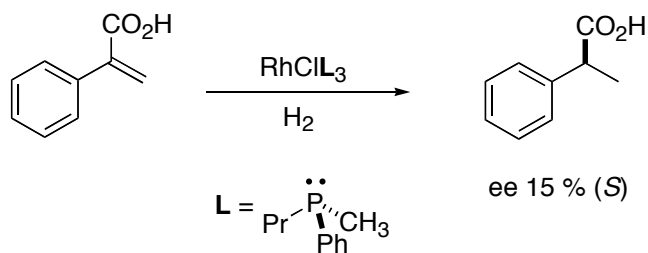


Figure 1. Hydrogénation asymétrique de l'acide \square -phénylacrylique par le complexe chiral RhClL_3 .

W. S. Knowles développa par la suite de nombreux ligands comme le PAMP (méthylphényl-*o*-anisylphosphine) et le CAMP (méthylcyclohexyl-*o*-anisylphosphine) pour l'hydrogénation asymétrique de l'acide \square -acétamidocinnamique (Figure 2).

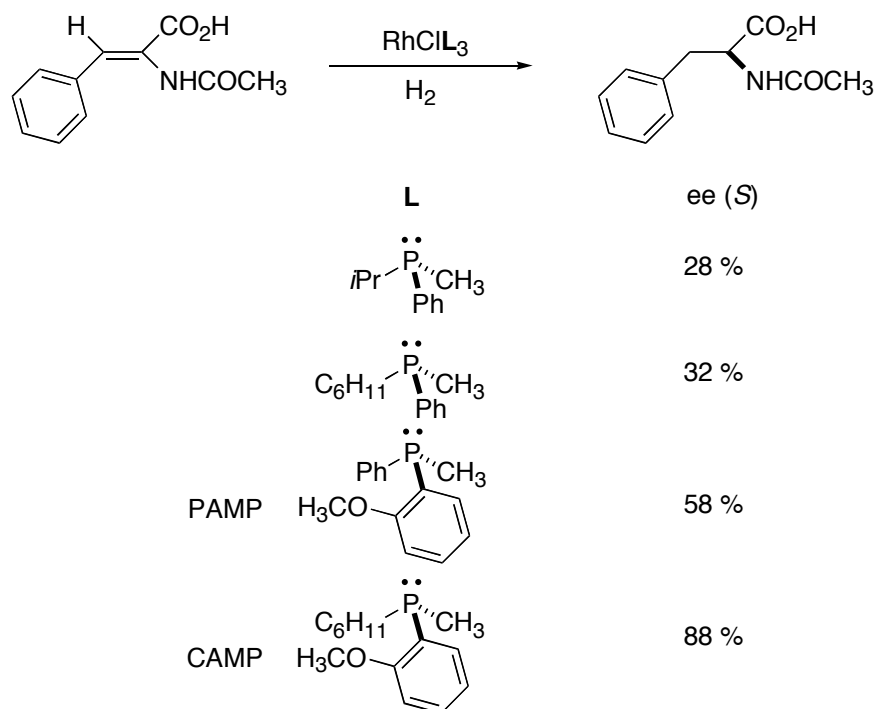


Figure 2. Hydrogénation asymétrique de l'acide \square -acétamidocinnamique par des complexes de types RhClL_3 préparés à partir de phosphines chirales.

Le ligand CAMP a été utilisé initialement pour la préparation industrielle de la (*S*)-DOPA ((*S*)-3-(3,4-dihydroxyphényl)alanine) (procédé Monsanto), un médicament utilisé pour le traitement de la maladie de Parkinson² (Figure 3).

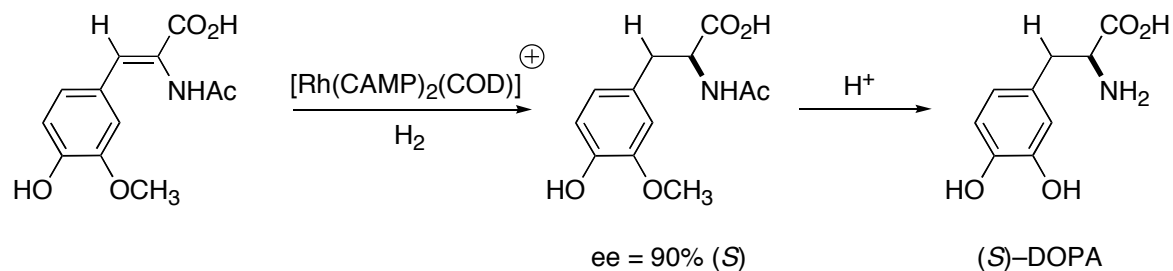


Figure 3. Une des étapes de la préparation industrielle de la (*S*)-DOPA.

Dans le domaine de l'hydrogénation asymétrique, H. Kagan développa un nouveau ligand, le (*R,R*)-DIOP⁶. Ce ligand bisphosphine de symétrie C_2 obtenu à partir de l'acide tartrique possède la chiralité sur les carbones et non sur les atomes de phosphores (Figure 4).

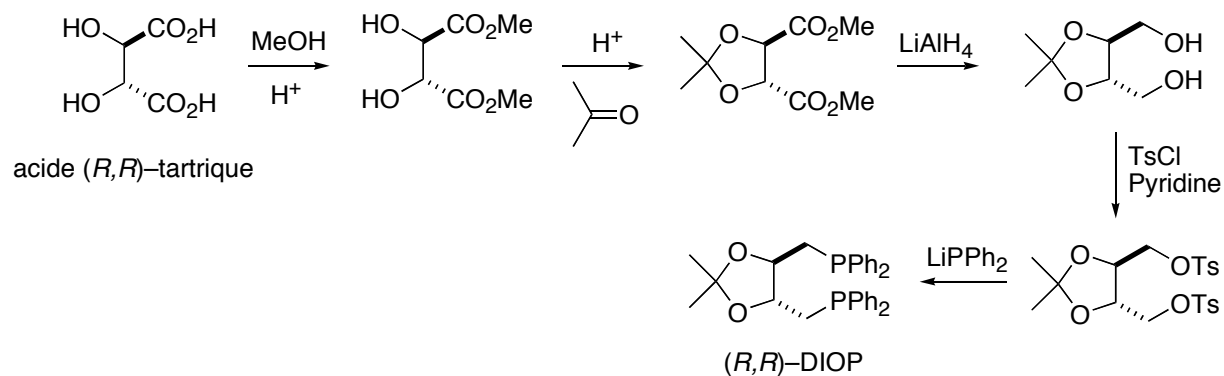


Figure 4. Préparation du ligand diphosphine (*R,R*)-DIOP à partir de l'acide (*R,R*)-tartrique.

Ce ligand donna les mêmes résultats que ceux obtenus précédemment avec le CAMP pour l'hydrogénation asymétrique de l'acide \square -acétamidocinnamique. Très rapidement, le CAMP

fut supplanté par le (*R,R*)-DIPAMP (Figure 5) pour la préparation industrielle de la (*S*)-DOPA (95% ee (*S*)).

La découverte du ligand de H. Kagan ouvra une nouvelle voie dans la synthèse de nouveaux composés bisphosphines^{3,7-11} (Figure 5).

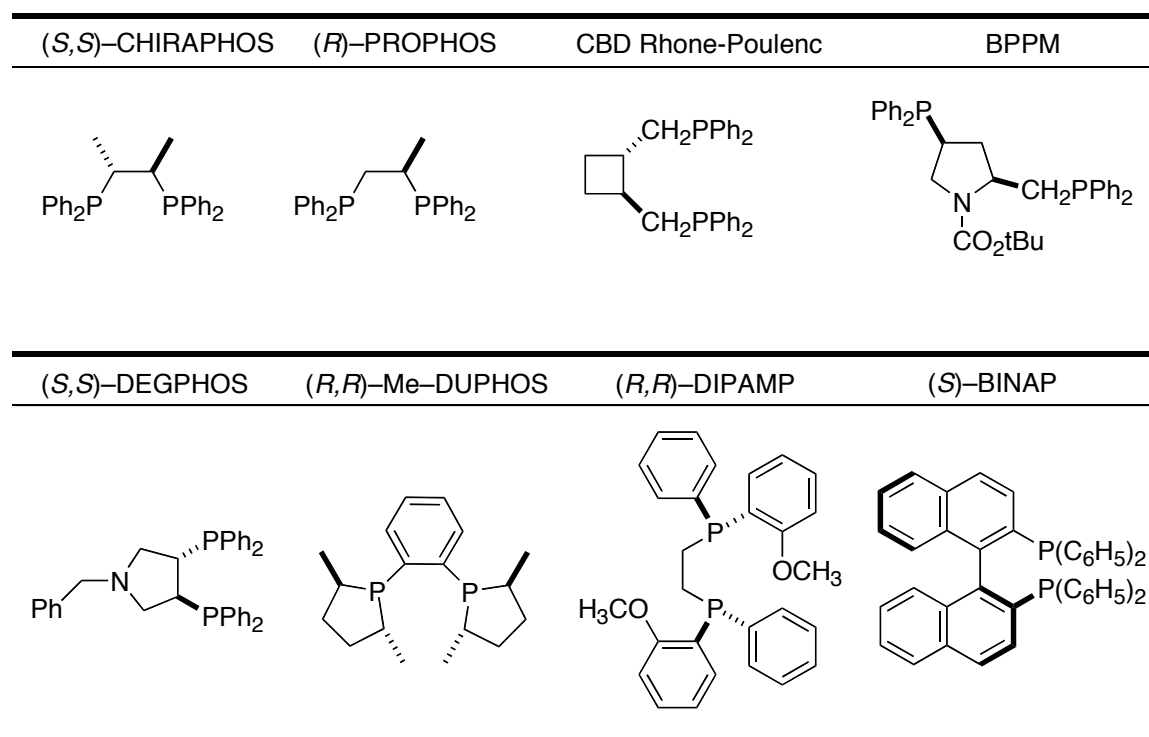


Figure 5. Listes de quelques ligands bisphosphines utilisés en catalyse^{3,7-11}.

Noyori a développé d'autres aspects de la chimie organique où la catalyse joue un rôle également important. Il élaborera en collaboration avec H. Takaya la synthèse d'un ligand de chiralité axiale: la BINAP (2,2'-bis(diphénylphosphanyl)- 1,1'-binaphtyl)^{3,12} (Figure 5). Le complexe cationique de rhodium $[Rh((S)\text{-BINAP})(\text{NBD})]^+$ a été utilisé avec succès dans l'isomérisation asymétrique d'amines allyliques permettant ainsi de produire industriellement des motifs présents dans certains antibiotiques comme des carbapénems, et de diverses fragrances comme le (*1R, 3R, 4R*)-menthol à partir du myrcène³ (Figure 6).

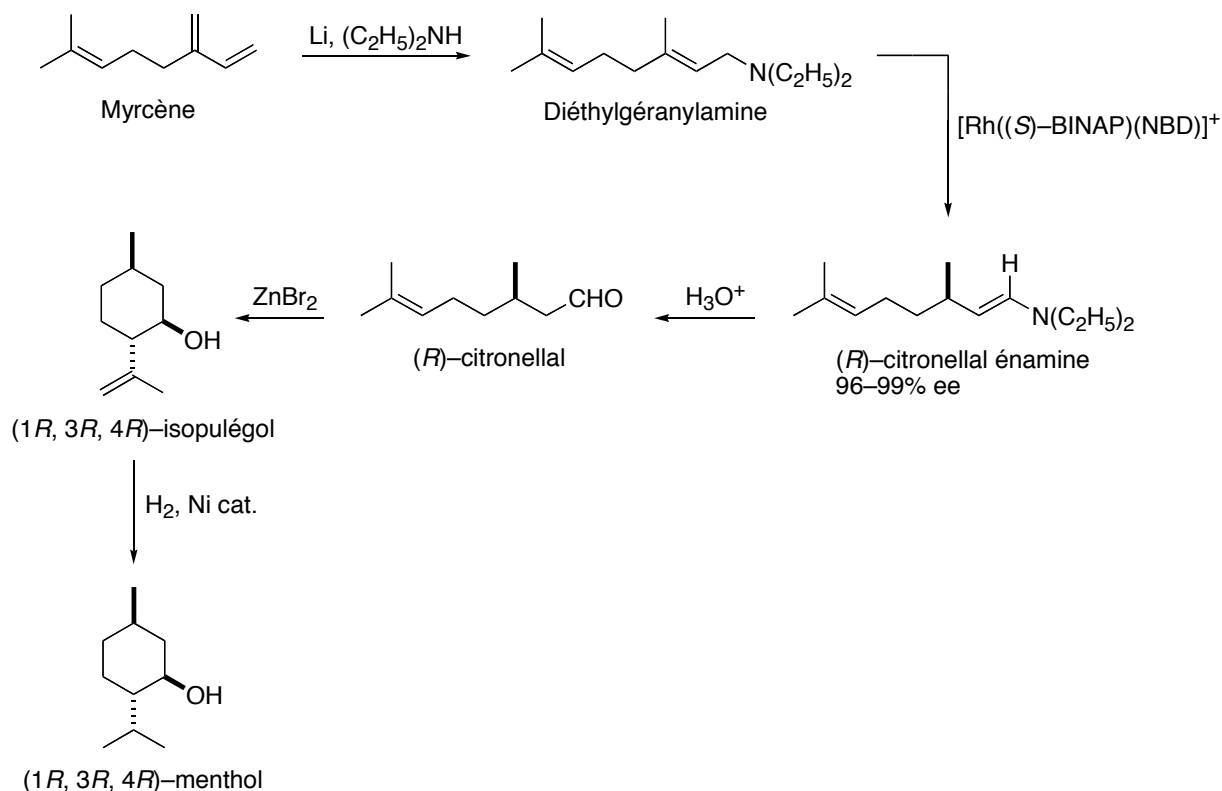


Figure 6. Synthèse du (*1R, 3R, 4R*)-menthol à partir du myrcène (Procédé Takasago).

Normalement, les doubles liaisons C=C sont plus réactives que les liaisons C=O en hydrogénation catalytique. En 1995, Noyori élaborait un complexe $[\text{RuCl}_2(\text{phosphine})_2(\text{diamine})]$ pour l'hydrogénation asymétrique et stéréosélective de cétones aromatiques, hétéroaromatiques et oléfiniques en présence d'une base¹³ (Figure 7). Par exemple l'acétophénone est catalytiquement hydrogénée (substrat/complexe = 100 000/1) par le complexe $[\text{RuCl}_2(\text{xyIBINAP})-(\text{DAIPEN})]$ pour former quantitativement l'alcool secondaire correspondant (ee 99%).

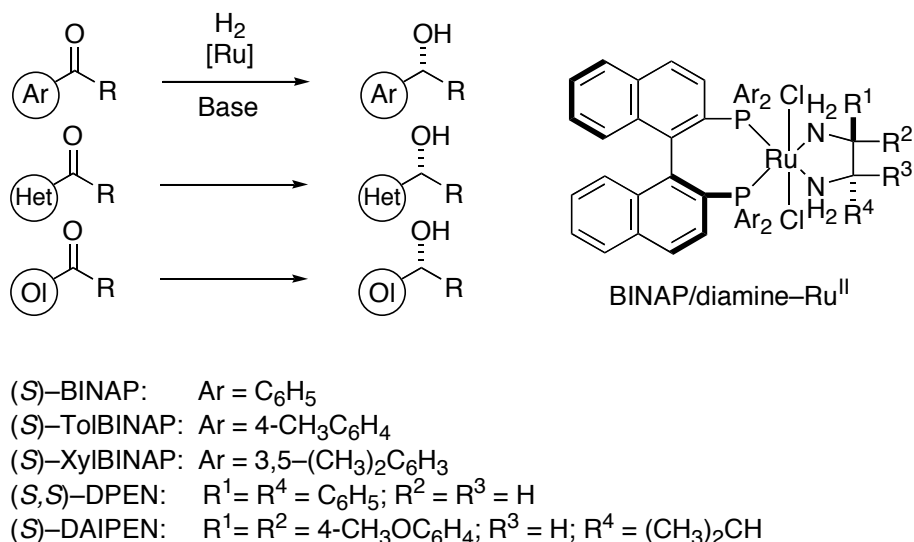


Figure 7. Hydrogénation asymétrique stéréosélective de cétones par le complexe BINAP/diamine. Ar = groupement aryle, Het = groupement hétéroaryle, Ol = groupement oléfinique.

Les travaux de B. Sharpless se situent dans le domaine de l'époxydation asymétrique d'alcools allyliques par l'utilisation d'un mélange de Ti(OiPr₄) (tétraisopropoxyde de titanium), d'oxydant *t*-BuOOH (hydropéroxyde de tertio-butyle) et d'un inducteur chiral DET ou DIPT (le diéthyltartrate ou diisopropylytartrate optiquement pur)^{4,14-16}. L'exemple suivant concerne l'époxydation du (*E*)-3,7-diméthyl-2,6octadièn-1-ol ou géraninol, un alcool allylique terpénique présent à l'état naturel dans l'essence de géranium¹⁴ (Figure 8).

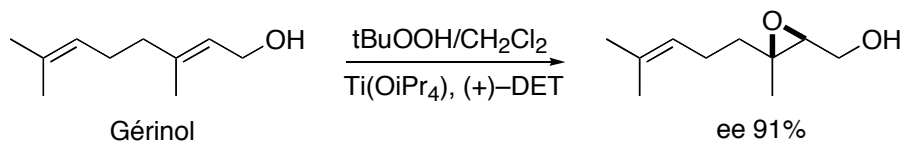


Figure 8. Epoxydation asymétrique de Sharpless sur le géraninol.

Les dérivés chiraux de la quinine et de la quinidine permettent de générer les deux diols énantiomères. La configuration absolue des carbones asymétriques est prédite en fonction de l'encombrement stérique engendré par la taille des différents substituants de l'oléfine¹⁸ (Figure 11).

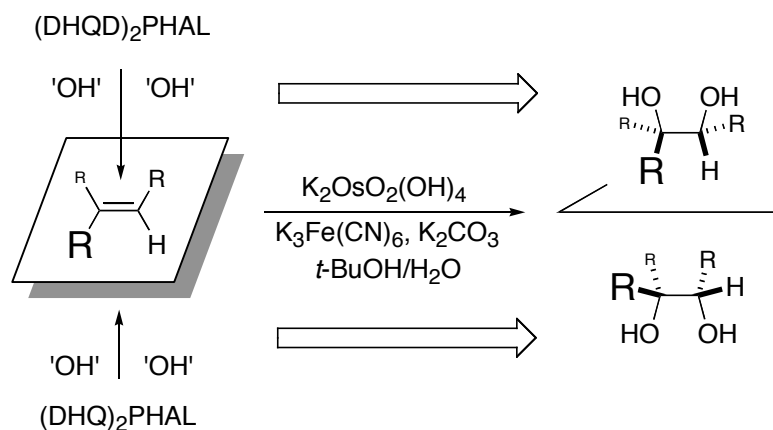
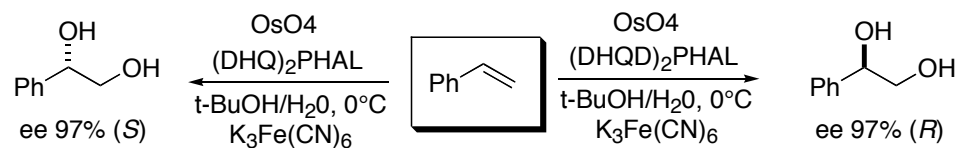


Figure 11. Sélectivité de la réaction de dihydroxylation. La taille de 'R' indique la taille des substituants (r = petit, R = moyen et R = grand).

En modifiant les conditions réactionnelles de la dihydroxylation, il est possible d'obtenir à partir d'oléfines des aminoalcools chiraux. Ces molécules font partie d'une classe de composés largement utilisés comme synthons pour la synthèse de composés pharmaceutiques. Les aminoalcools chiraux sont très efficaces dans le traitement des maladies de coeur¹⁹⁻²¹ et se retrouvent également dans la structure d'immunodépresseurs²². Les aminoalcools chiraux sont également utiles comme ligands en catalyse asymétrique. La source d'azote dans cette réaction d'aminohydroxylation est un sel d'ammonium dérivé de sulfonamide, de carbamate ou d'amide^{23, 24}. Le groupement hydroxy provient de l'eau. La sélectivité de la réaction est la même que celle décrite pour la réaction de dihydroxylation. Deux exemples de réactions de dihydroxylation et d'aminohydroxylation sont présentés ci-dessous^{19, 25} (Figure 12):

a) Dihydroxylation du styrène



b) Aminohydroxylation du cinnamate de méthyle

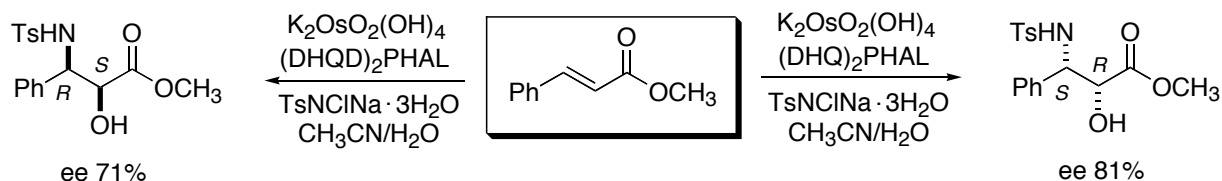


Figure 12. a) exemple de réaction de dihydroxylation sur la styrène, b) exemple de réaction d'aminohydroxylation sur le cinnamate de méthyle.

I.1.3. Les limites de l'utilisation de catalyseurs dans l'industrie

Malgré une avancée significative de la catalyse énantiosélective, l'utilisation de catalyseurs efficaces pour des applications industrielles reste cependant assez modeste. Ceci est dû en grande partie aux problèmes rencontrés lors la production à grandes échelles de produits chiraux²⁶. Plusieurs facteurs critiques déterminent la faisabilité d'un procédé industriel énantiosélectif²⁷:

- i) L'énantiosélectivité d'un catalyseur doit être supérieure à 99% ee pour des composés pharmaceutiques et supérieure à 80% ee pour des produits agroalimentaires.
- ii) Généralement, les ligands chiraux et les métaux sont coûteux et peu commercialisés. Le coût de ligands diphosphines chirales est de l'ordre de \$5000-20000/Kg.

Malgré une application modeste dans l'industrie des catalyseurs chiraux, leur développement est toujours d'actualité. La chimie combinatoire a permis la découverte et l'élaboration de nouveaux catalyseurs chiraux²⁸. Le choix du ligand chiral est primordial. Un système catalytique efficace est obtenu après de nombreux essais et échecs. Cette optimisation réside dans de nombreux facteurs comme: la structure du ligand, la nature de l'ion métallique, la stoechiométrie, le solvant, la température, l'ajout d'additifs²⁹. À la vue d'un tel challenge, la méthode combinatoire semble être une réponse efficace à un scénario aussi complexe. Cette technique est aujourd'hui largement utilisée dans la chimie pharmaceutique. À ce jour, la chimie combinatoire est un outil indispensable pour l'optimisation et le développement de systèmes catalytiques et énantiosélectifs efficaces³⁰.

I.2. La catalyse enzymatique: Généralités

La catalyse enzymatique est devenue un outil de synthèse pour la préparation de composés chiraux³¹. L'application classique de biotransformation est la résolution cinétique d'un mélange racémique. Un des exemples les plus marquants est la production d'amines chirales par une lipase (procédé utilisé par BASF, Allemagne)³² (Figure 13).

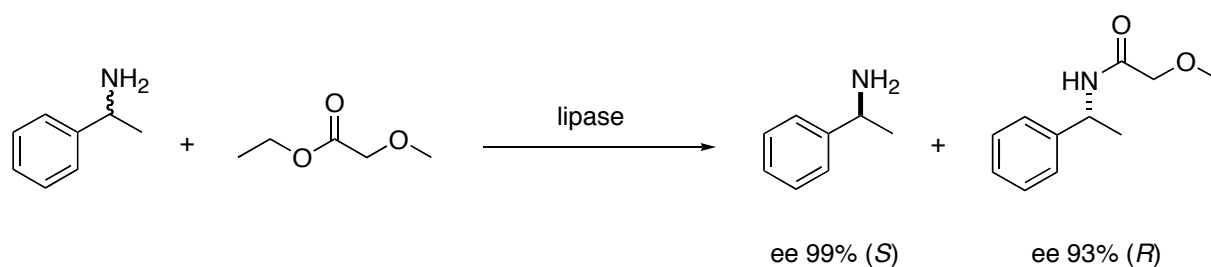


Figure 13. Résolution cinétique d'une amine racémique par une lipase.

L'utilisation d'enzymes permet ainsi de contrôler la stéréosélectivité de nombreuses réactions comme la réduction de cétones prochirales par des oxydoréductases, la synthèse d'alcools par des lyases³³.

Dans les années 1980, l'utilisation de microorganismes pour l'hydrogénation d'énones et de nitrooléfines a connu un véritable essor. Cependant l'hydrogénation enzymatique de doubles liaisons C=C d'énones α,β insaturées conduit parfois à la réduction du carbonyle générant alors la formation d'alcools saturés³⁴. En 1983, H. Ohta utilisa la levure *Corynebacterium equi* IFO 3730 pour l'hydrogénation de la double liaison C=C de chalcones^{35, 36} (Figure 14). Dans le cas où $R_1 = H$ et $R_2 = H$, la conversion est quantitative au bout de 3h à 30°C.

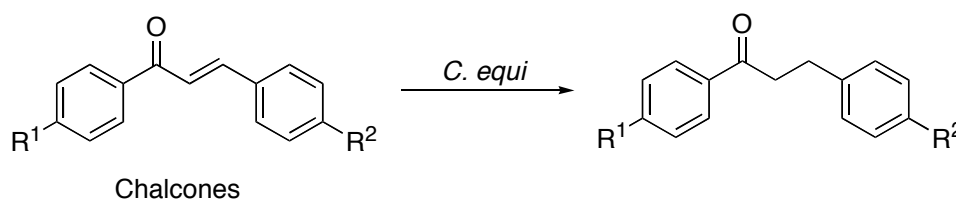


Figure 14. Hydrogénation de chalcones par le microorganisme *Corynebactérium equi* IFO 3730.

Sakai et coll ont testé différents microorganismes pour l'hydrogénation asymétrique de la nitrooléfine 1-(4-hydroxyphényl)2-nitropropène³⁷ (Figure 15). Les composés nitro optiquement actifs sont très utiles pour leurs propriétés antibiotiques³⁸ et peuvent être facilement convertis en amines, acides carboxyliques et cétones.

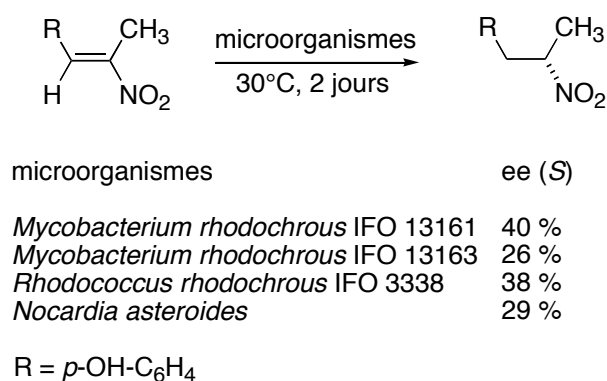


Figure 15. Hydrogénation asymétrique de la nitrooléfine 1-(4-hydroxyphényl)2-2 nitropropène par quelques microorganismes.

En se basant sur le même principe, H. Ohta utilisa la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* comme microorganisme pour l'hydrogénation asymétrique de nitrooléfines³⁹. Tous ces microorganismes ne nécessitent pas l'apport d'hydrogène gazeux pour effectuer la réduction des doubles liaisons C=C. H. Hashimoto effectua en 1975 l'hydrogénation stéréosélective d'acides gras α,β insaturés α -halogénés par le microorganisme *Clostridium kluveri* en présence d'hydrogène gazeux⁴⁰.

Dans le cas de la biocatalyse, un grand nombre de substrats n'est pas converti avec des taux de sélectivité acceptables. Afin de remédier à ce problème de spécificité de substrat, des méthodes d'évolution dirigée d'enzymes ont été mises en œuvre⁴¹⁻⁴⁵. Le point de départ de cette méthode est l'utilisation d'une enzyme catalysant non sélectivement une réaction de type A \rightarrow B. Une première mutagénèse aléatoire est effectuée sur cette enzyme par des méthodes de biologie moléculaire. Après expression des enzymes mutantes dans un microorganisme approprié, leurs activités et sélectivités sont testées sur la réaction A \rightarrow B. Le gène mutant de l'enzyme donnant les meilleurs résultats subit à nouveau une mutagénèse aléatoire. De nouvelles enzymes mutantes sont à nouveau testées. Le procédé est répété jusqu'à obtenir une enzyme dont la sélectivité est optimale.

Cependant le nombre de biocatalyseurs utilisés dans l'industrie est relativement modeste. Ceci est dû en particulier aux coûts engendrés pour l'élaboration d'un tel procédé (la haute sélectivité, la concentration du produit, les purifications, les rendements)⁴⁶.

I.3. Comparaisons entre la catalyse homogène et enzymatique

À la vue des différences qui existent entre la catalyse homogène et la catalyse enzymatique (Tableau 1), il apparaît que ces deux systèmes sont complémentaires sous bien des aspects: en incorporant un catalyseur précurseur organométallique dans une protéine, des métalloenzymes artificielles sont créées, alliant les propriétés des catalyseurs homogènes et des catalyseurs enzymatiques.

	Catalyse homogène	Catalyse enzymatique
Variété du substrat	Grande	Limitée
Enantiomères	2 énantiomères obtenus	Un seul énantiomère
Tolérance pour les groupements fonctionnels	Faible	Grande
Répertoire de réactions	Grand	Faible
Nombre de "turnover"	Faible	Elevé
Compatibilité avec les solvants organiques	Grande	Faible (eau)
Optimisation	Chimique	Génétique
Seconde sphère de coordination	Mal définie	Bien définie

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

Ainsi, le catalyseur hybride possède les propriétés de catalyse homogène comme un répertoire de réactions plus large (hydrogénation, oxydation, etc...), une variété de substrat plus grande pour une réaction donnée (spécificité du substrat rencontrée fréquemment en catalyse

enzymatique). En empruntant les caractéristiques de la catalyse enzymatique, le catalyseur hybride possède une seconde sphère de coordination bien définie⁴⁷ et peut effectuer des réactions en milieu aqueux sous conditions douces. Ces métalloenzymes artificielles peuvent être préparées par incorporation covalente ou supramoléculaire de complexes organométalliques précurseurs dans des protéines.

I.4. Elaboration de métalloenzymes artificielles

I.4.1. Incorporation covalente de complexes organométalliques dans une protéine

Inspirés des travaux de E. T. Kaiser, de nombreux groupes de recherche ont récemment développé des méthodes permettant l'incorporation covalente de catalyseurs de métaux de transition dans des protéines⁴⁸.

Grâce à l'avancée de la mutagenèse dirigée, il est désormais possible de modifier un résidu acide aminé dans une région spécifique d'une protéine. L'étape clef de la modification génétique des protéines par mutagenèse dirigée réside dans la PCR "Polymerase Chain Reaction" (ou ACP pour "Amplification en Chaîne par Polymérase"). Cette technique de répllication ciblée *in vitro*^{49,50} permet de réaliser une succession de réactions de répllication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre 2 amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre (Figure 16). Les amorces ou "primers" (en anglais) définissent alors en la bornant, la séquence à amplifier. Imaginée par K. Mullis en 1985 (Prix Nobel en 1993), cette technique connaît un essor considérable dès la commercialisation vers 1988 d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées: la *Taq* polymérase. Cette enzyme permet l'automatisation de la technique.

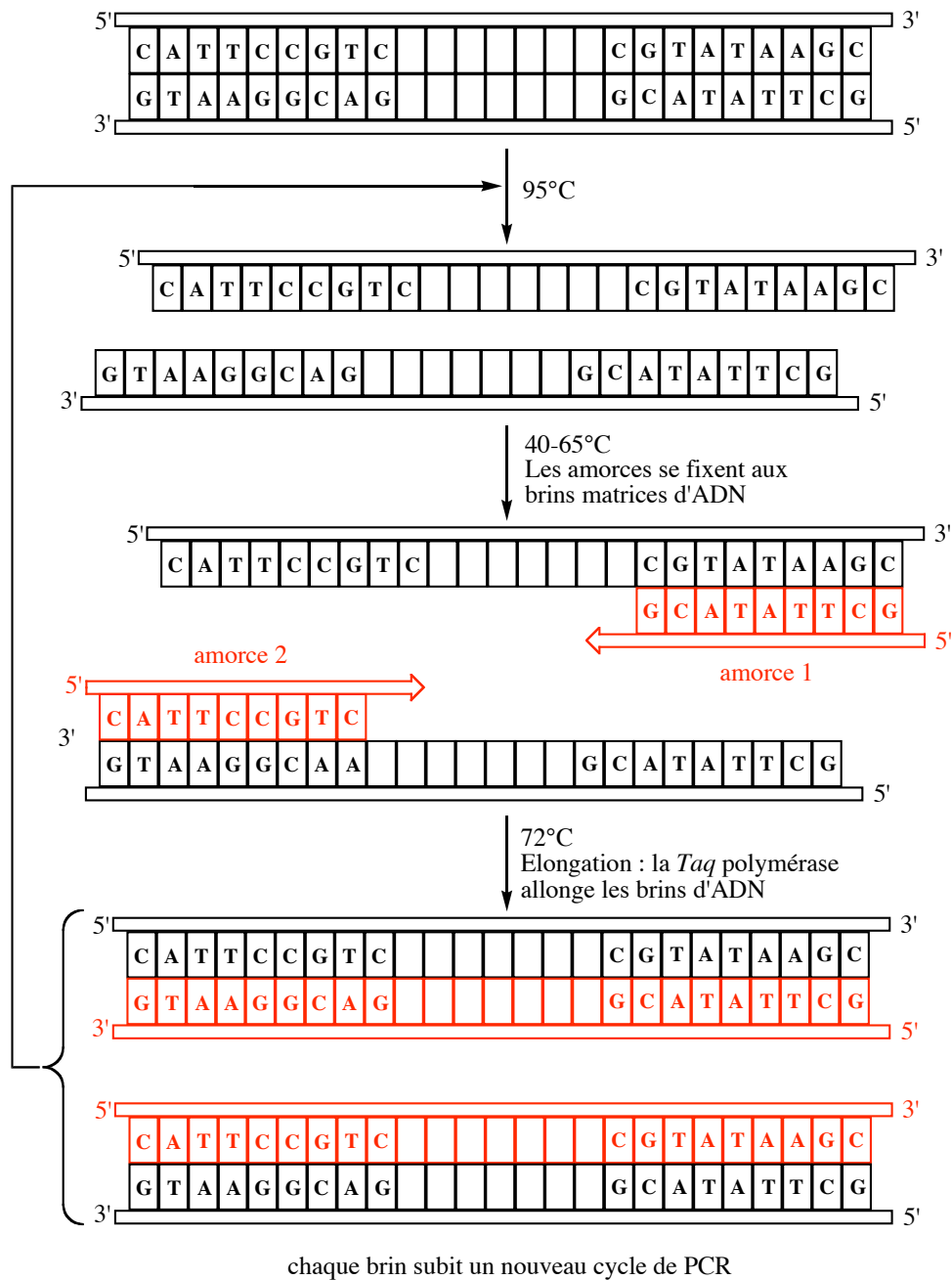


Figure 16. Principe de la PCR.

A 95°C, les liaisons faibles qui assurent la cohésion du double brin (ou du plasmide) sont rompues pour donner 2 simples brins d'ADN. A 40-65°C, l'hybridation des amorces repose sur le principe de l'appariement des bases complémentaires. A 72°C, on assiste à l'étape d'élongation: les amorces hybridées à l'ADN, servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire. La polymérisation effectuée par la *Taq* polymérase se fait

par ajout successif de bases désoxyribonucléotides (présentes dans le mélange en large excès). Chaque base ajoutée est complémentaire à la base correspondante du brin matrice. En un cycle, l'amplification produit de nouvelles molécules d'ADN à partir d'une seule molécule matrice. Le processus est répété à volonté, chaque cycle doublant le nombre de molécule d'ADN (croissance exponentielle). Pour obtenir des protéines mutantes par mutagenèse dirigée, la technique de PCR est appliquée en utilisant des amorces portant la mutation désirée. Après amplification du gène, la protéine est exprimée dans un microorganisme. On obtient alors une protéine mutante dont la séquence d'acides aminés est différente de celle la protéine dite "wild type". En appliquant la méthode de PCR, il est possible d'introduire dans une région spécifique de la protéine un résidu cystéine, ce dernier pouvant être par la suite fonctionnalisé de façon covalente par divers réactifs (par exemple, par la création de liaison disulfure), modifiant ainsi les propriétés de l'enzyme⁵¹ (Figure 17).

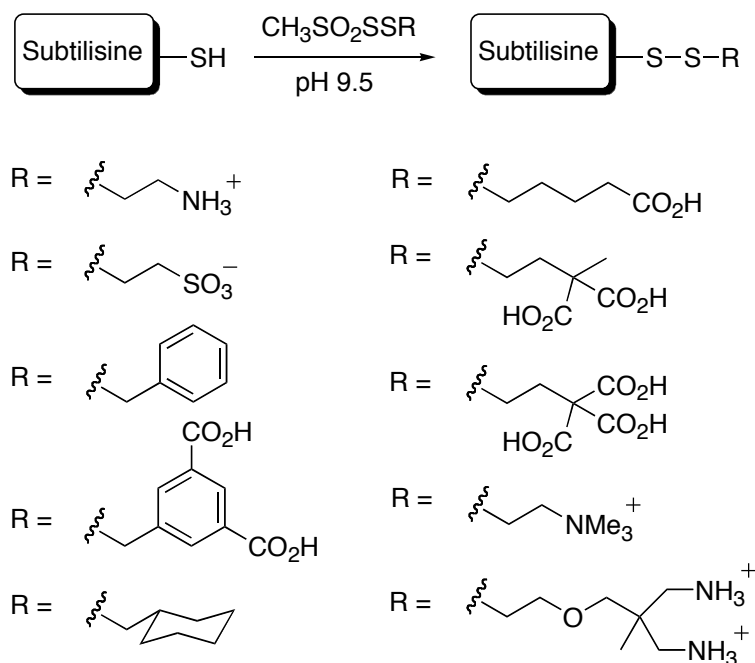


Figure 17. Fonctionnalisation d'un résidu cystéine de la subtilisine par création de liaison covalente disulfure.

L'introduction d'un complexe de métal de transition dans une enzyme a été réalisée d'une façon élégante par K. D. Janda⁵². La méthode repose sur la modification chimique d'un résidu lysine Lys^{H93} situé dans la poche hydrophobe de l'anticorps 38C2. La fonctionnalisation de la lysine s'effectue de façon covalente par un composé bis-imidazole. L'introduction du cuivre Cu (II) peut être réalisée avant ou après cette modification⁵² (Figure 18).

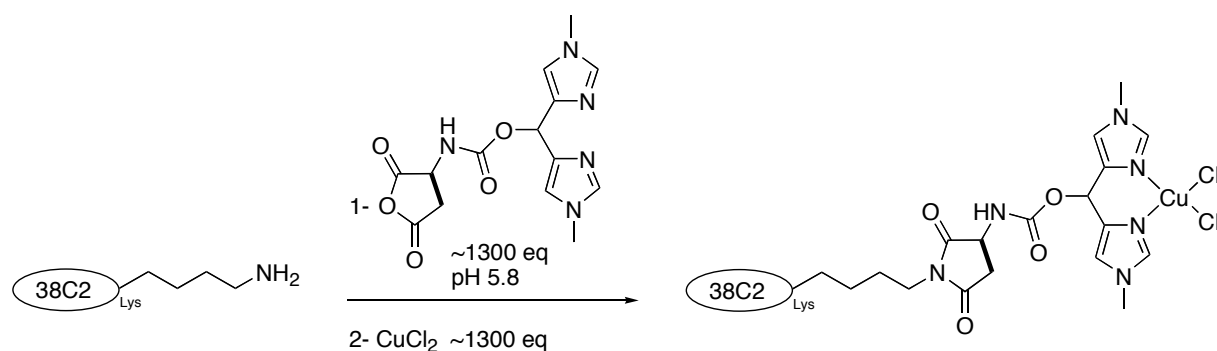


Figure 18. Incorporation covalente d'un complexe de cuivre (II) dans l'anticorps 38C2.

L'incorporation d'un complexe de métal de transition dans une protéine a également été réalisée par M. D. Distefano par modification chimique du résidu cystéine Cys¹¹⁷ (introduit par mutagenèse dirigée) de la protéine ALBP (protéine liant des lipides adipocytes) par l'iodoacétamido-1,10-phénanthroline (Figure 19)⁵³.

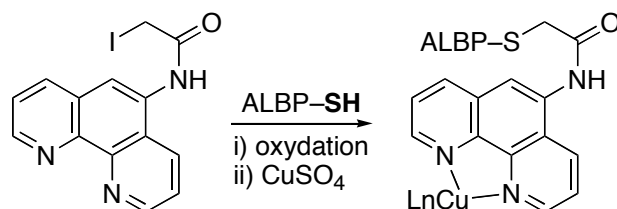


Figure 19. Incorporation covalente d'un complexe de cuivre (II) dans la protéine ALBP.

Reetz incorpora un ligand bidenté diphosphine dans une enzyme⁵⁴. Le ligand est lié à un phosphonate (Figure 20). Cette molécule fait partie d'une classe de composés réagissant facilement avec les résidus sérine présents dans le site catalytique des lipases:

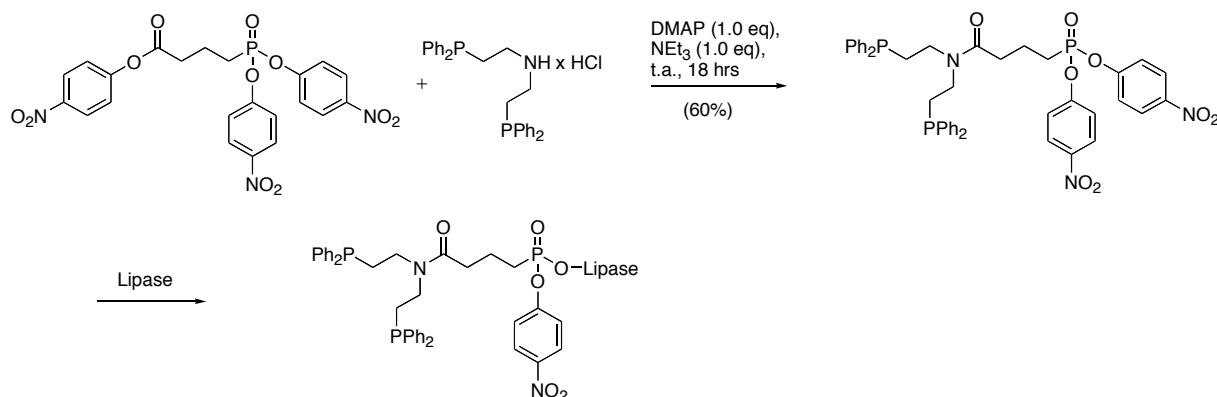


Figure 20. Incorporation covalente d'un ligand diphosphine dans une lipase.

I.4.2. Incorporation non covalente de complexes organométalliques dans une protéine

I.4.2.1. Le système biotine–(strept)avidine

L'avidine est une protéine que l'on trouve dans le blanc d'œuf de reptiles, d'amphibiens et de volatiles. Elle est sécrétée sous la forme d'une protéine tétramérique d'un poids moléculaire d'environ 65000 g/mol^{55,56}. Cette protéine est glycosylée (classe N)⁵⁷. Dans les glycoprotéines de classes N, la chaîne glucidique est fixée à l'atome d'azote de la chaîne latérale d'une glutamine, dans celles de classes O, la chaîne glucidique est fixée à l'atome d'oxygène de la chaîne latérale d'une sérine ou d'une thréonine⁴⁹ (Figure 21).

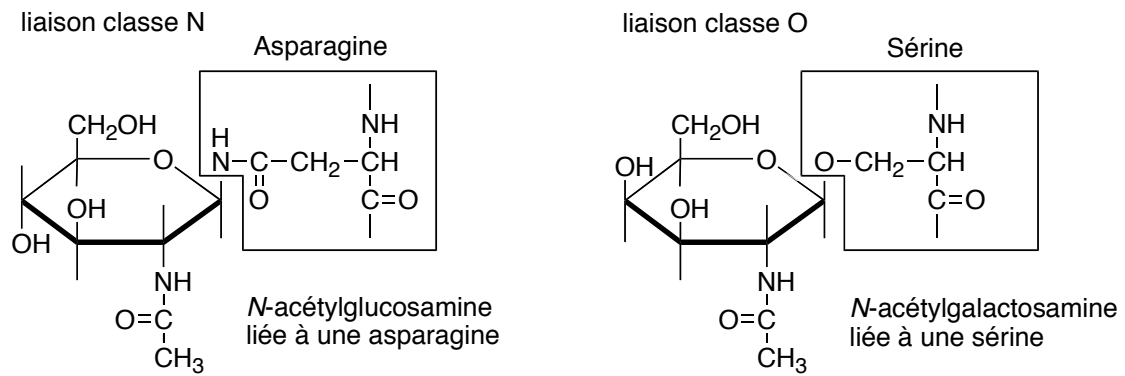


Figure 21. Les deux classes possibles de glycosylation.

Chaque monomère de l'avidine est constitué de 128 acides aminés qui ont la particularité de fixer de façon non covalente la (+)-biotine: la vitamine H (Figure 22)⁵⁸⁻⁶⁰. La constante d'affinité entre la protéine et cette petite molécule est très forte⁶¹ et est de l'ordre de $K_a \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$.

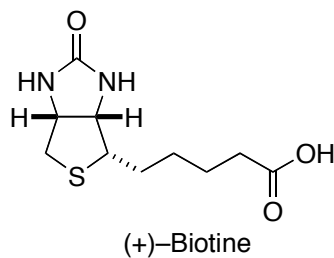


Figure 22. La (+)-Biotine.

Ce système avidine-biotine représente l'un des plus extraordinaires phénomènes de fixation biologique dans la nature entre une protéine et un ligand⁶² (Tableau 2), ce qui lui confère le titre de "velcro moléculaire".

Systèmes	Constantes d'affinité (Ka, M ⁻¹)
Avidine-biotine	1.7 x 10 ¹⁵
Streptavidine-biotine	2.5 x 10 ¹³
Protéase-inhibiteur	10 ¹⁰ –10 ¹³
Récepteur-ligand	10 ⁹ –10 ¹²
Antigène-anticorps	10 ⁷ –10 ¹¹
Lectine-sucre	10 ³ –10 ⁶
Enzyme-substrat	10 ³ –10 ⁵

Tableau 2. Constantes d'affinités de complexe protéine–ligand présents dans la nature⁶².

Cependant, comme l'indique le tableau ci-dessus, un analogue de l'avidine possède également une très forte affinité pour la biotine: la streptavidine, protéine obtenue à partir de la bactérie souche *Streptomyces avidinii*⁶³. La constante d'affinité est environ de 10¹³ M⁻¹.

I.4.2.1.1. L'affinité de la biotine pour la (strept)avidine: Rationalisation

Toutes les protéines sont formées d'une succession d'acides aminés liés les uns aux autres dans un ordre précis. La séquence des acides aminés d'une protéine constitue ce que l'on appelle la structure primaire. La structure secondaire est surtout le résultat de la rigidité des liaisons amides et de la maximalisation des interactions par liaisons hydrogène et autres liaisons non covalentes au sein de la(des) chaîne(s). Il existe alors deux arrangements importants: l'hélice α et le feuillet β .

La caractéristique principale de l'hélice α est l'enroulement de la chaîne peptidique de telle manière que le groupe carbonyle des liaisons peptidiques partage une liaison hydrogène avec le groupe amide des liaisons peptidiques situées quatre résidus en aval sur la chaîne

polypeptidique. Les liaisons hydrogènes sont à peu près parallèles à l'axe de l'enroulement et le pas de l'hélice est d'environ 5.4 Å. Les chaînes latérales des acides aminés pointent à l'extérieur de l'hélice. Un feuillet β se forme quand deux zones d'un polypeptide s'accolent de façon parallèle ou antiparallèle en partageant des liaisons hydrogènes entre les groupes amides (N-H) d'un peptide et les groupes carbonyles (C=O) d'un second. Les feuillets β se forment en plusieurs tronçons de la protéine⁴⁹. Finalement, le plissement, l'enroulement et les autres processus d'agrégation des polypeptides aboutissent à ce que l'on appelle leur structure tertiaire. La structure tertiaire des enzymes et des protéines fait généralement apparaître des cavités tridimensionnelles qu'on appelle sites actifs. Certaines protéines adoptent une structure quaternaire dans laquelle des chaînes d'acides aminés, chacune possédant sa propre structure tertiaire, se combinent pour former une structure plus volumineuse.

Le monomère de l'avidine native est constitué de 124 acides aminés et celui de la streptavidine de 159 acides aminés. Le dessin ci-dessous montre la similitude qui existe entre les deux protéines du point de vue de la composition des acides aminés⁶³ (Figure 23). L'homologie entre les différents acides aminés de chaque séquence est d'environ 30%⁶⁴.

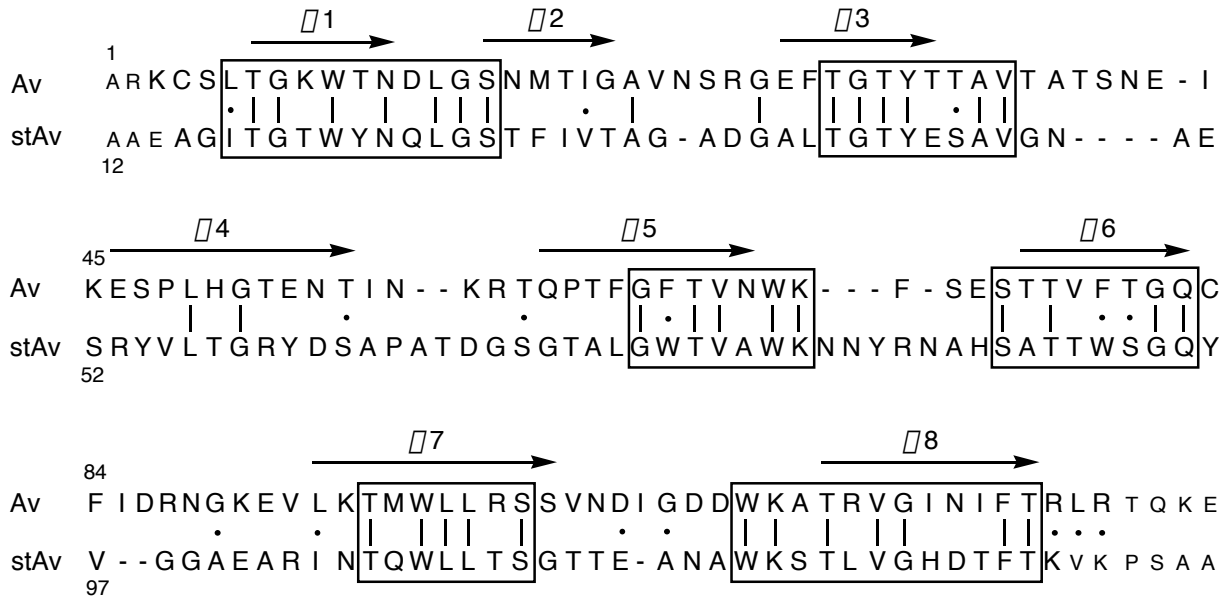


Figure 23. Superposition des séquences d'acides aminés de l'avidine (Av) et de la streptavidine (StAv) monomériques. L'homologie entre les différents acides aminés de chaque séquence est représentée par un cadre. Les résidus acides aminés identiques entre les deux protéines sont signalés par un trait et ceux qui sont similaires par un point.

Chaque monomère est constitué de 8 feuillets α positionnés de façon antiparallèle et reliés entre eux par des boucles plus ou moins flexibles. Par exemple la boucle située entre le feuillet $\alpha 3$ et $\alpha 4$ est appelée boucle L 3,4. Cette succession de feuillets α constitue la structure tertiaire d'un monomère de (strept)avidine et lui donne la forme d'un tonneau. Ainsi, la cavité qui se forme est le site de fixation de la biotine à la protéine. La figure ci-dessous représente une sous-unité de l'avidine et de la streptavidine où la biotine est ancrée dans le site actif (Figure 24).

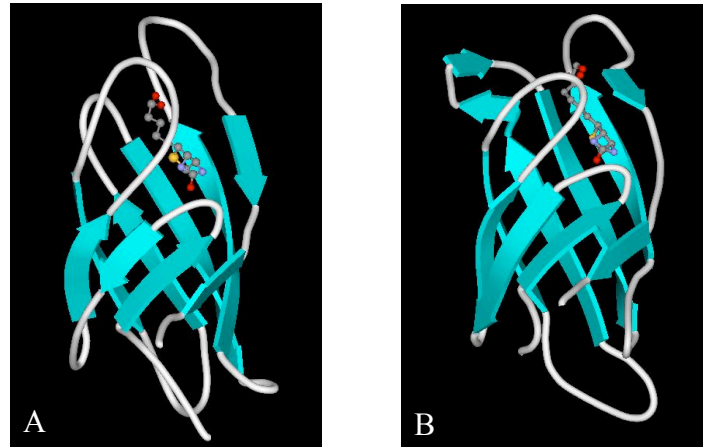


Figure 24. A) Représentation d'un monomère de l'avidine, B) Représentation d'un monomère de la streptavidine. La biotine est représentée au centre de chaque sous unité.

Les 4 sous-unités s'assemblent pour former une structure quaternaire de symétrie 222. La taille approximative du tétramère est de 56x50x40Å⁵⁶. Les différences structurales majeures qui existent entre les deux protéines résident dans la taille et la conformation de leurs 6 boucles reliant les 8 feuilletts β . Les études aux rayons X du complexe biotine-avidine montrent clairement le site de fixation de la biotine à la protéine^{63,65,66}. Le cycle tétrahydrothiofène de la biotine est profondément ancré dans la cavité chirale de la protéine⁶⁷. La poche, très profonde, a un volume approximatif de 293 Å³. Cette cavité est large et son accessibilité est due en grande partie à la flexibilité de la boucle L 3,4 qui permet un accès rapide de la biotine dans le site actif^{56, 68}.

Le rôle des résidus présents dans le site actif pour la stabilisation du complexe biotine-(strept)avidine a été initialement étudié par N. M. Green en 1963⁶⁹: la très forte affinité de la biotine pour la (strept)avidine réside dans les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes entre la biotine et les résidus acides aminés présents dans chaque site actif⁷⁰⁻⁷².

Des études cristallographiques ont permis de déterminer la structure du complexe biotine-(strept)avidine^{73,74}. Les résidus tryptophanes jouent un rôle très important dans les interactions hydrophobes avec la biotine et contribuent à la forte affinité de la vitamine H pour la (strept)avidine: la mutation dirigée des tryptophanes W 110 dans l'avidine et W 120 dans la streptavidine fait diminuer l'affinité de la biotine pour les deux protéines ($K_a = 10^8 \text{ M}^{-1}$)^{75,76}. Ces deux tryptophanes jouent un rôle crucial dans l'affinité de la biotine pour la (strept)avidine et contribuent également à la stabilité du tétramère⁷⁷.

Les liaisons hydrogènes entre la biotine et les résidus présents dans chaque site actif contribuent à la stabilité du complexe biotine-(strept)avidine. La conformation fermée de la boucle L 3,4 résulte de la formation de ponts hydrogène entre la biotine et les résidus acides aminés présents sur cette boucle (Tyr 43, Ser 45, Glu 49 dans le cas de la streptavidine)⁷⁸. Il existe des différences notables dans les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes entre les deux protéines (Figure 25)⁶³: elles sont plus nombreuses dans le cas de l'avidine, ce qui explique une constante d'affinité plus forte pour le complexe biotine-avidine ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$) que pour le complexe biotine-streptavidine ($K_a = 10^{13} \text{ M}^{-1}$)^{63,67}.

Toutes modifications des résidus présents dans le site actif par voie chimique⁷⁹ ou par mutagenèse dirigée⁷⁷, influencent directement ou indirectement l'affinité de la vitamine pour la protéine. La fonction urée du cycle tetrahydrothiofène de la biotine contribue fortement à la stabilité du système. Cependant, la dérivatisation du groupement carboxylique de la biotine a une faible incidence sur l'affinité des complexe biotine-(strept)avidine⁶¹. La dénaturation de la protéine seule s'effectue à des températures voisines de 85°C, alors que le complexe biotine-(strept)avidine est stable jusqu'à des températures avoisinant les 130°C^{64, 80-82}.

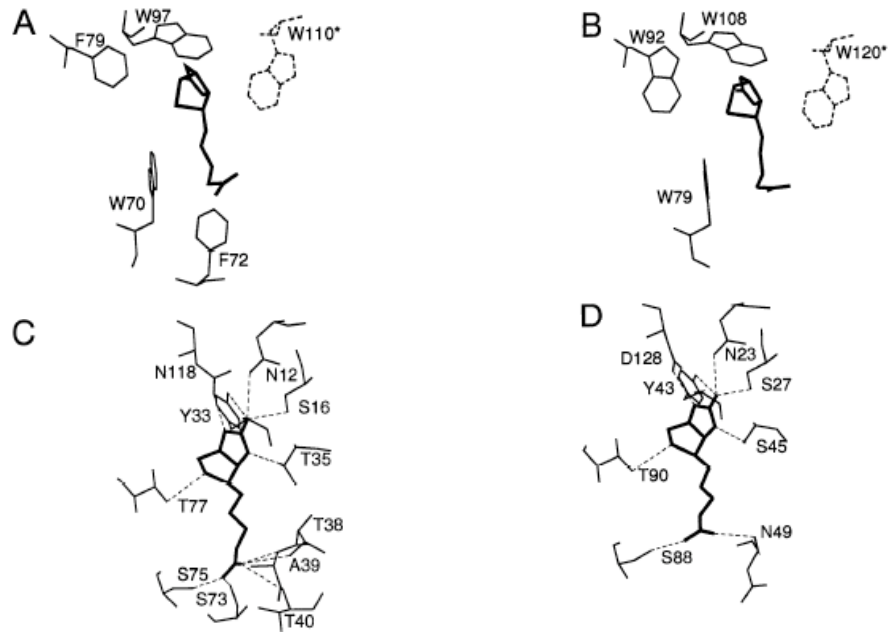


Figure 25. Sites actifs de l'avidine et de la streptavidine. A) résidus hydrophobes présents dans le site actif de l'avidine B) résidus hydrophobes présents dans le site actif de la streptavidine C) liaisons hydrogènes entre la biotine et les résidus du site actif de l'avidine D) liaisons hydrogènes entre la biotine et les résidus du site actif de la streptavidine⁶³.

I.4.2.1.2. Les applications de la technologie biotine–(strept)avidine dans le domaine de biotechnologie

Ces 30 dernières années, la technologie biotine–(strept)avidine a trouvé de nombreuses applications dans le domaine de la biologie moléculaire, la biotechnologie (ELISA, immunomarqueurs...) ^{62, 83} et la médecine (comme la localisation de cellules cancéreuses) ^{84, 85}. Par exemple, dans le domaine de la microbiologie et du diagnostic clinique ⁸³, plusieurs molécules de biotines peuvent être couplées de manière covalente à des anticorps: la fixation de l'anticorps sur l'antigène n'est pas affectée ⁸⁶. Quelques exemples sont illustrés dans la Figure 26. Le premier résidu dans le marquage radioactif de la streptavidine par un atome ou

une enzyme. La protéine radioactive se fixe alors au complexe biotine–anticorps (Figure 26a). Etant donné que la streptavidine a la capacité de fixer 4 molécules de biotine, cette particularité peut être utilisée afin d’amplifier le signal: la streptavidine se fixe à un anticorps biotinylé et à 3 molécules de biotine couplées à une enzyme marquée (Figure 26b). La troisième variante permet d’amplifier fortement le signal en utilisant des complexes tridimensionnels de streptavidine et de composés radioactifs biotinylés (Figure 26c).

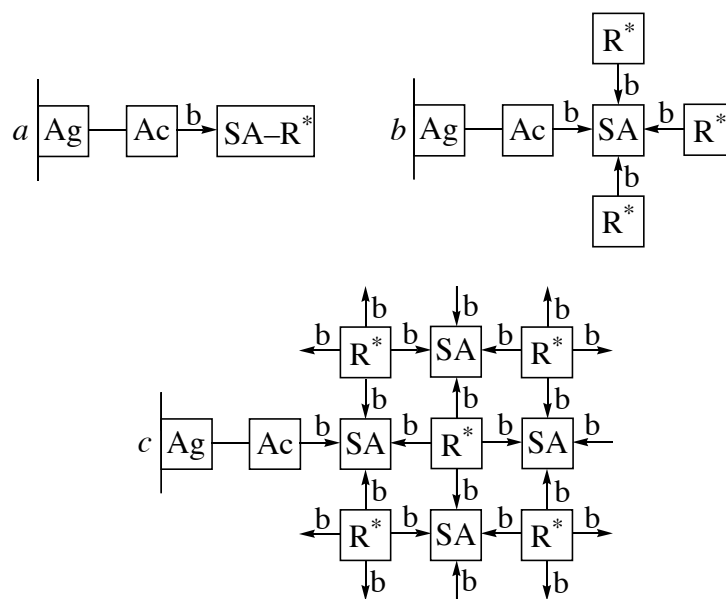


Figure 26. Schématisation de l’utilisation du système streptavidine–biotine en immunologie pour la détection d’antigènes. Ag: Antigène, Ac: anticorps, SA: Streptavidine, b: biotine et R* : espèce radioactive. a: fixation du complexe biotine–streptavidine radioactive sur un anticorps pour la détection d’antigène, b: amplification du signal pour la détection de l’anticorps, c: suramplification du signal par création de complexes tridimensionnels.

La streptavidine est largement utilisée en immunologie au détriment de l’avidine. Ceci est dû en partie à la glycosylation de l’avidine qui, par le biais de ces chaînes carbohydrates, peut se fixer aux sucres des protéines constituant la surface des cellules⁸⁷.

I.4.2.1.3. Les applications de la technologie biotine–(strept)avidine dans le domaine de la catalyse

Dans le domaine de la chimie, G. Whitesides fut le premier à suggérer l'utilisation de l'avidine comme hôte chiral pour la catalyse énantiosélective⁸⁸. En incorporant un complexe achiral biotinylé rhodium-diphosphine dans l'avidine, il réalisa l'hydrogénation asymétrique de l'acide \square -acétamidoacrylique (Figure 27). La chiralité induite par la protéine permet d'obtenir la (*S*) *N*-acétamidoalanine avec un excès énantiomérique de 41%.

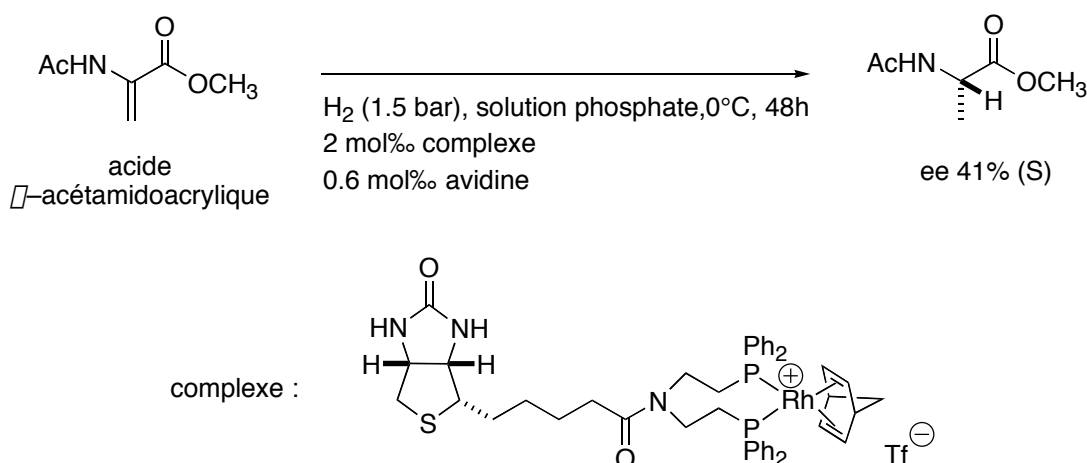


Figure 27. Hydrogénation énantiosélective de l'acide \square -acétamidoacrylique par incorporation non-covalente dans l'avidine d'un complexe de rhodium (I).

Plus récemment, Chan étudia l'influence de différents paramètres (pH, température et pression) sur l'hydrogénation asymétrique de l'acide itaconique en introduisant un complexe chiral biotinylé pyrphos–rhodium dans la cavité de l'avidine (Figure 28)⁸⁹. Ainsi la réduction asymétrique de l'acide itaconique par le complexe $[\text{Rh}((S,S)\text{-pyrphos-biotine})(\text{COD})]^+$ sous 1 bar d'hydrogène, à 22°C à pH 7 permet d'obtenir l'énantiomère (*R*) de l'acide méthylsuccinique avec un excès énantiomérique de 48%. Ce même énantiomère est obtenu

avec un excès énantiomérique de seulement 11% avec le complexe $[\text{Rh}((R,R)\text{-pyrphos-biotine})(\text{COD})]^+$: cependant en modifiant les conditions opératoires (pH, température et pression), il est possible d'obtenir préférentiellement avec ce complexe l'énantiomère (*S*) de l'acide méthylsuccinique (ee 37%).

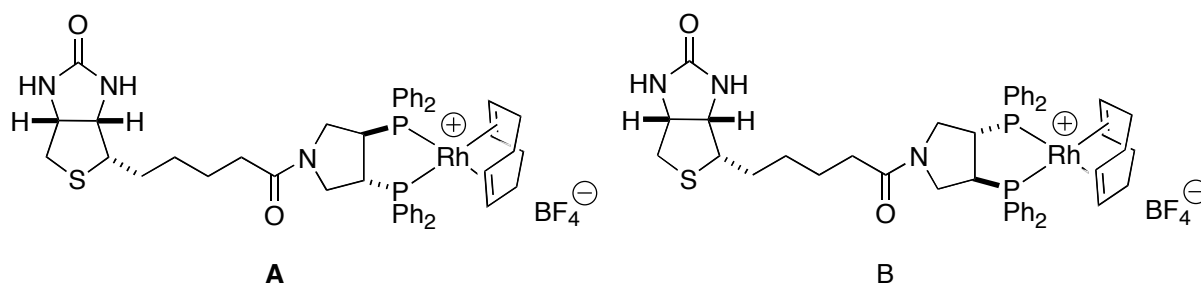


Figure 28. Complexes chiraux biotinylés pyrphos-rhodium : A) $[\text{Rh}((R,R)\text{-Pyrphos-Biotine})(\text{COD})]\text{BF}_4$, B) $[\text{Rh}((S,S)\text{-Pyrphos-Biotine})(\text{COD})]\text{BF}_4$

I.5. Objectifs du travail de thèse

Les objectifs de la thèse ont portés sur l'incorporation non covalente de catalyseurs précurseurs organométalliques dans des protéines en utilisant la technologie biotine-(strept)avidine. Ces métalloenzymes artificielles ont été testées sur l'hydrogénation énantiosélective de l'acide β -acétamidoacrylique (Figure 29). Des méthodes chimiques et génétiques ont été élaborées afin d'optimiser l'énantiosélectivité des catalyseurs hybrides.

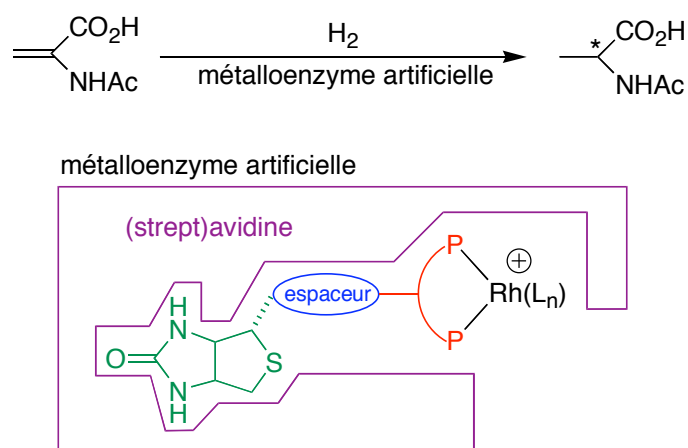


Figure 29. Métalloenzymes artificielles pour l'hydrogénation énantiosélective de l'acide Δ -acétamidoacrylique. La protéine (hôte en violet) possède une très forte affinité pour la biotine (ancre en vert).

La préparation des métalloenzymes a reposé sur l'incorporation de complexes biotinylés dans la protéine. Afin de déterminer un environnement chiral favorable dans la protéine, différents espaceurs achiraux ont été introduits entre la biotine et le groupement diphosphine par le biais d'acides aminés aliphatiques et aromatiques. L'objectif étant de faire varier la position du complexe organométallique dans la protéine. L'introduction d'un espaceur entre la biotine et le groupement diphosphine et la variation de conformation du chélate ont conduit à l'optimisation chimique (modification de la première sphère de coordination). La mutagénèse dirigée des protéines a permis l'optimisation de l'énantiosélectivité par modification de la seconde sphère de coordination.

Plusieurs études ont réalisées avec différentes métalloenzymes (comme l'influence du pH, de la pression en hydrogène sur la catalyse etc...). Nous avons tenté de comprendre et d'apporter des explications sur le phénomène de l'hydrogénation asymétrique de l'acide Δ -acétamidoacrylique dans une protéine.

CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Introduction

Afin d'élaborer des métalloenzymes artificielles, différents ligands biotinylés ont été préparés: la modification chimique de la première sphère de coordination a été réalisée en faisant varier la conformation du chélate et en introduisant différents espaceurs entre la biotine et le groupement disphosphine du ligand. Les métalloenzymes artificielles ont ensuite été testées en catalyse (étude de la pression, comportement des sites actifs, vitesse de réaction dans la protéine...). La mutagénèse dirigée de l'avidine et la streptavidine a conduit à l'optimisation de l'énantiosélectivité par modification génétique de la seconde sphère de coordination.

II.2. Préparations de ligands aminodiphosphines biotinylés

II.2.1. Préparation du ligand Biot-1 sans espaceur

Les études préliminaires de l'hydrogénation asymétrique de l'acide \square -acétamidoacrylique, en utilisant l'avidine comme inducteur chiral, ont été réalisées par G. Whitesides en 1978 par incorporation du complexe achiral $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{NBD})]\text{BF}_4$ dans la protéine⁸⁸. La synthèse du ligand biotinylé **Biot-1** est préparée de la façon suivante (Figure 30): La (+)-Biotine est dérivatisée par la *N*-hydroxysuccinimide (NHS) pour former l'ester activé de la (+)-Biotine **5**. Cet ester est couplé à l'aminodiphosphine H-1 générant ainsi le ligand biotinylé **Biot-1**⁹⁰.⁹¹ Après sa précipitation dans l'eau et sa purification sur colonne de silice (SiO_2), le rendement est de 80%.

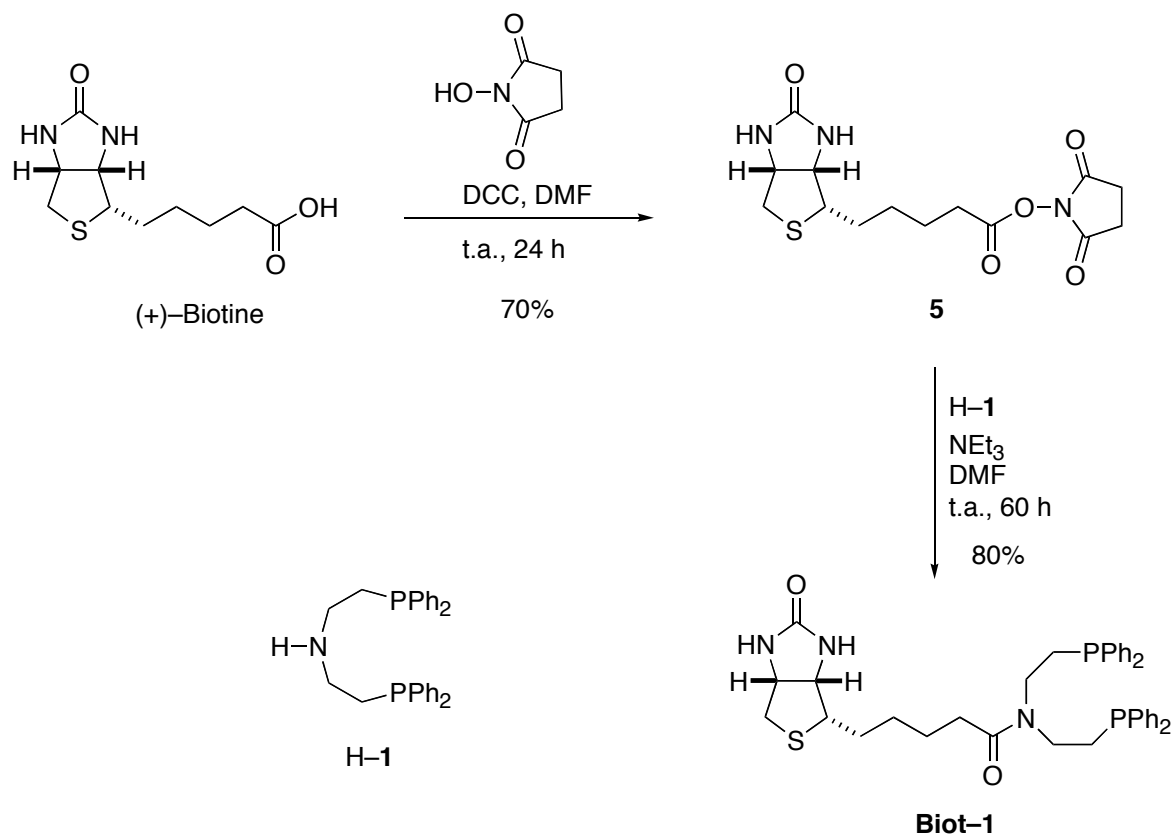


Figure 30. Synthèse du ligand biotinylé **Biot-1**.

II.2.2. Tentatives de préparation de ligands diphosphines

Etant donné que le ligand bidenté précédent **Biot-1** (amine endocyclique flexible) forme un chélate à 8 chaînons avec le métal, nos efforts se sont portés sur l'élaboration d'un ligand biotinylé possédant une amine exocyclique et formant un chélate à 6 chaînons: le principe étant de voir l'effet de la conformation du chélate sur l'énantiosélectivité.

II.2.2.1. À partir du sérinol

L'objectif de ce travail est de substituer les deux groupements hydroxy du sérinol (composé commercial) par deux groupements diphosphines -PPh_2 . La première étape de synthèse consiste à protéger le groupement amino du sérinol à l'aide du di-terbutyle de carbonate $(\text{Boc})_2\text{O}$ dans l'éthanol pour donner l'amine Boc protégée **6** (Figure 31). Le composé **6** est obtenu avec un rendement de 83%. Le composé **7** s'obtient après méthylation par le chlorure de méthanesulfonyle $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ du diol **6** sous conditions basiques (NEt_3). Le rendement de la réaction est de 84%. Ces deux composés **6** et **7** ont été préparés en reproduisant le protocole opératoire décrit par E. Benoist⁹².

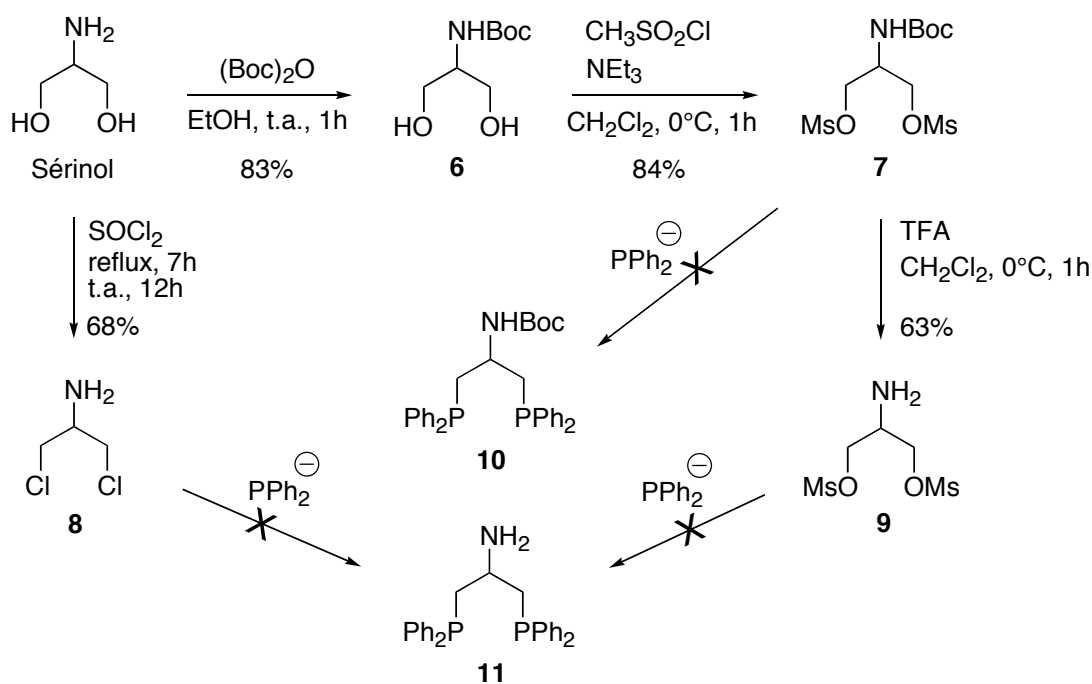


Figure 31. Synthèse des composés **6**, **7**, **8** et **9** à partir du sérinol. Tentatives de préparation des diphosphines **10** et **11**.

L'étape suivante réside dans la substitution nucléophile des deux groupements mésylate du composé **7** par un phosphore afin d'obtenir le ligand bidenté **10**. Différentes approches ont été élaborées en vue de l'obtention de ce composé (Tableau 3).

1) Le phosphore est obtenu par réaction de la diphenylphosphine HPh_2 avec $t\text{BuOK}$ (tert-butoxyde de potassium) (entrée 1, tableau 3) dans le THF anhydre. La substitution du bis-mésylate **7** n'a pas lieu. L'avancement de la réaction par RMN ^{31}P montre la présence de HPh_2 non réagi ($\delta = -39$ ppm), de l'oxyde de diphenylphosphine HOPPh_2 ($\delta = 22.5$ ppm) et d'autres oxydes au bout de 12h dans le THF à reflux.

Entrées	Réactif	Conditions opératoires
1	7	HPh_2 , $t\text{BuOK}$ THF anhydre, reflux, 12h
2	7	HPh_2 , NaH THF anhydre, reflux, 18h
3	7	HPh_2 , BuLi, 0°C THF anhydre, reflux, 12h
4	7	HPh_2 , BuLi, 0°C THF anhydre, reflux, 2h

Tableau 3. Récapitulatif des conditions opératoires réalisés sur le réactif de départ **7**.

2) Une seconde expérience est réalisée en préparant le phosphore à partir de la diphenylphosphine et l'hydrure de sodium NaH (entrée 2). L'avancement de la réaction montre aucune réaction au bout de 2h dans le THF à reflux. Deux signaux apparaissent à -39.6 ppm et 20 ppm caractéristiques de HPh_2 et de l'oxyde de diphenylphosphine respectivement. Au bout de 18h de réaction, aucun changement n'est observé.

3) Un nouvel essai est alors réalisé en préparant le phosphure d'une façon différente: en faisant réagir à 0°C HPPH₂ et le butyllithium BuLi (entrée 3). Au bout de 12h dans le THF à reflux, on observe toujours la présence de HPPH₂ non réagi, de deux nouveaux signaux à -22 ppm et -23 ppm pouvant correspondre aux composés mono- et bisphosphines. Aucun oxyde ne se forme. Une extraction est réalisée à l'acétate d'éthyle: on observe alors uniquement la présence d'oxydes (23 ppm, 32 ppm etc...). L'oxydation des composés a lieu lors de ce traitement.

4) L'expérience précédente est reproduite (entrée 4). Cependant, le temps de réaction est seulement de 2h au lieu de 12h. L'avancement de la réaction par RMN ³¹P montre les mêmes signaux que ceux décrits dans l'expérience précédente avant l'extraction : -39 ppm (HPPH₂), -22.6 et -22.2 ppm. Après évaporation du solvant, une tentative de purification des produits est effectuée en réalisant une chromatographie sur silice (SiO₂) sous atmosphère inerte avec l'éluant toluène/acétate d'éthyle (6:1). Deux produits non séparés sont obtenus (leur R_f étant très proche) avec les signaux en RMN ³¹P à -23.6 ppm et -23 ppm. On observe la présence d'oxydes, ce qui semble indiquer que les produits se dégradent lors de leur élution sur la colonne.

À la vue de ces premières expériences, il s'avère difficile d'obtenir la di-substitution du bis-mésylate **7** par le diphenylphosphure. Dans chaque cas, on observe la présence de HPPH₂ en RMN ³¹P. L'amine protégée -NHBoc peut réagir avec des composés organométalliques de type RLi⁹³ (dans notre cas R = -PPH₂), ce qui peut expliquer la difficulté à substituer le bis-mésylate **7** par le phosphure qui réagit sur l'amine protégée. De ce fait, deux nouveaux composés ont été préparés à partir du sérinol (Figure 31). Les composés **8** et **9** ne possèdent pas l'amine primaire protégée par Boc. Le composé **8** est obtenu par chloration du sérinol

dans le chlorure de thionyle SOCl_2 à reflux⁹⁴. Le rendement est de 68%. Le composé **9** est préparé en effectuant la déprotection de l'amine du bis-mésylate **7** par l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane à 0°C. Le composé **9** est obtenu avec un rendement de 63%.

G. Whitesides a préparé l'amine diphosphine H-1·HCl en faisant réagir la bis(2-chloroéthyle) amine hydrochlorure **12** avec le phosphore, préparé à partir de la diphénylphosphine et *t*BuOK dans le THF⁹¹ (Figure 32).

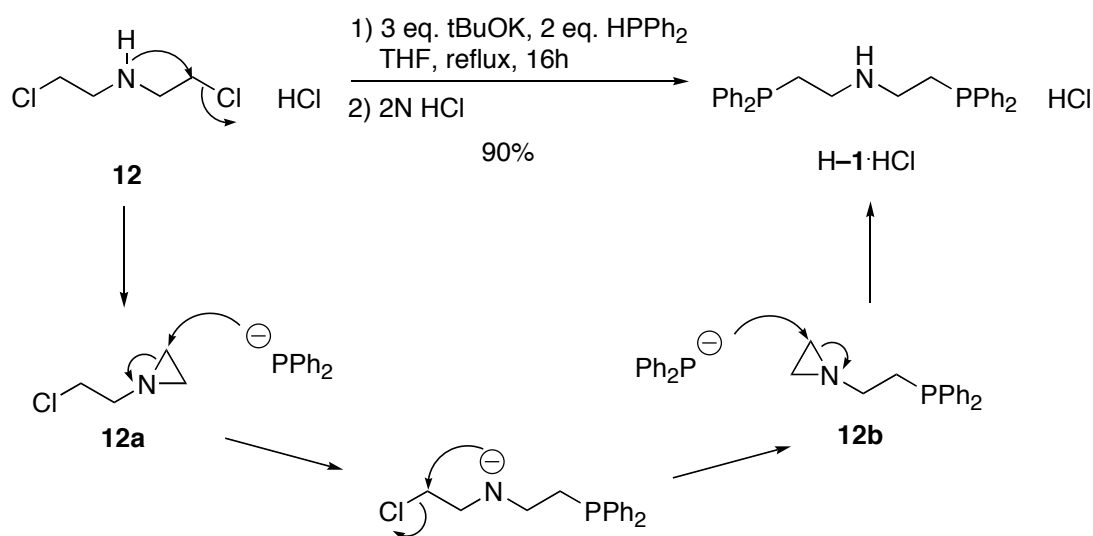


Figure 32. Mécanisme de formation de l'amine diphosphine H-1·HCl à partir de l'amine **12**: attaque nucléophile $\text{S}_{\text{N}}2$ des aziridines **12a** et **12b** (formées *in situ*) par le phosphore.

Ces mêmes conditions opératoires ont été utilisées pour la substitution des groupements chlorures du composé **8** par le phosphore KPPH_2 (utilisation de 2 équivalents de *t*BuOK) en vue de la préparation du composé **11** (entrée 1, tableau 4).

Entrées	Réactif	Conditions opératoires
1	8	HPPh ₂ , <i>t</i> BuOK THF anhydre, reflux, 16h
2	9	HPPh ₂ , <i>t</i> BuOK THF anhydre, reflux, 12h

Tableau 4. Récapitulatif des conditions opératoires réalisés sur les réactifs de départ **8** et **9**.

Le résultat est assez surprenant. L'avancement de la réaction par RMN³¹P montre la présence de la diphenylphosphine ($\delta = -39.2$ ppm) et de son oxyde ($\delta = 22.5$ ppm). La di-substitution n'a pas lieu. Le mécanisme réactionnel ci-dessous est proposé pour expliquer ce phénomène (Figure 33).

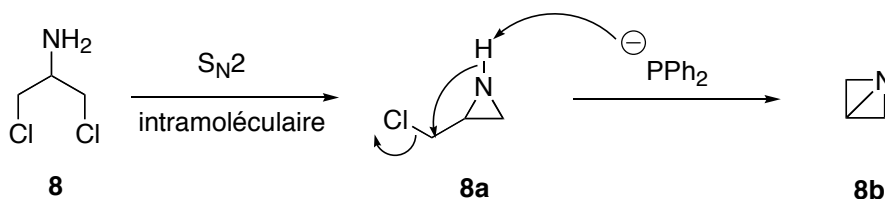


Figure 33. Proposition d'un mécanisme réactionnel pour la formation du 1-azabicyclo[1.1.0]butane **8b**.

Comme dans le cas de l'amine **12**, la substitution intramoléculeire d'un chlorure de l'amine **8** conduit à la formation de l'aziridine **8a**. Le brevet déposé en 1996 par Hayashi et coll.⁹⁵ décrit la réactivité de l'aziridine **8a** vis à vis de nucléophiles. L'amine secondaire **8a** est déprotonnée par la base forte $KPPH_2$ qui, après une substitution S_N2 intramoléculeire, conduit à la formation du 1-azabicyclo[1.1.0]butane **8b** et de la diphenylphosphine $HPPH_2$ ($\delta = -40$ ppm). Dans le cas de l'aziridine **12a**, ce mécanisme réactionnel ne peut avoir lieu: on se trouve en présence d'une amine tertiaire.

Afin d'éviter la formation du composé **8b**, l'expérience précédente est reproduite sur le composé **9** (entrée 2, tableau 4). Les chlores du composés **8** sont substitués par des groupements mésylate car selon les données du brevet, la formation du composé **8b** a lieu préférentiellement à partir de l'aziridine **8a** halogénée (Cl, Br, I). Au bout de 12h de reflux dans le THF, on observe la formation de nombreux oxydes ($\delta = 19.9$ à 39 ppm). La di-substitution n'a toujours pas lieu: la composé **11** n'est pas obtenu.

La solution pour la préparation d'un ligand diphosphine serait d'utiliser un dérivé du sérinol possédant de bons groupes partants et volumineux comme le groupement tosylate (composé **13**) et de coupler ce composé directement sur l'ester activé de la (+)-Biotine **5**, s'affranchissant ainsi de la protection du groupement amino et de sa réactivité vis à vis du phosphore. Cela permettrait d'obtenir en deux étapes un nouveau composé biotinylé bidenté (Figure 34).

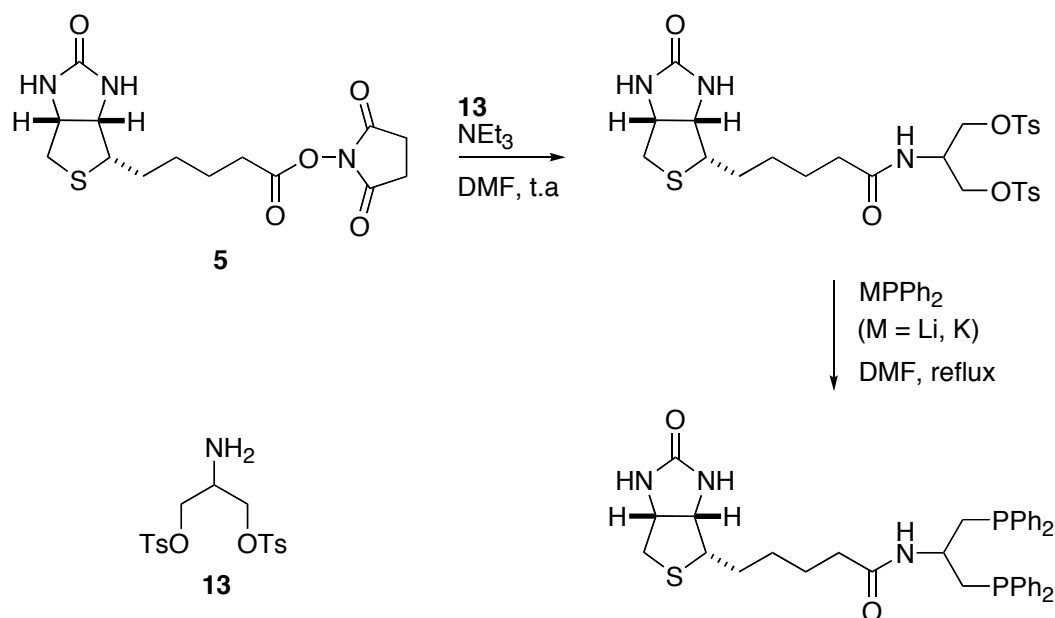


Figure 34. Proposition de synthèse d'un composé biotinylé bidenté à partir de l'ester activé de la (+)-Biotine **5** et de l'amine bis-tosylate **13**.

II.2.2.2. À partir de l'épichlorohydrine

L'épichlorohydrine **14** est un très bon précurseur pour la préparation d'alcool diphosphine **15**. Le mécanisme de formation du composé **15** est décrit ci-dessous⁹⁶ (Figure 35). L'ouverture de l'époxyde par l'attaque nucléophile du phosphore génère un alcoolate qui, en éliminant un chlorure, génère à nouveau un époxyde. Son ouverture s'effectue par l'attaque nucléophile d'un second équivalent de phosphore.

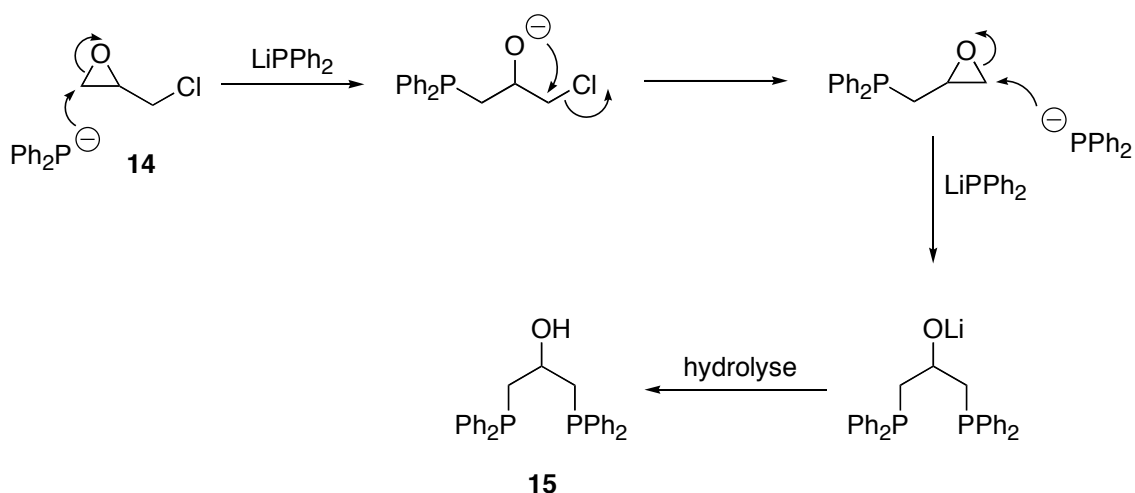


Figure 35. Mécanisme proposé pour la formation du composé **15** à partir de l'épichlorohydrine **14**.

Le composé **15** est obtenu avec un rendement de 71% (Figure 36). Contrairement au sérinol, cette nouvelle molécule ne possède pas de groupement amino. Le but des prochaines expériences est d'introduire un groupement NH_2 en vue du couplage de l'aminodiphosphine sur un ester activé de la biotine.

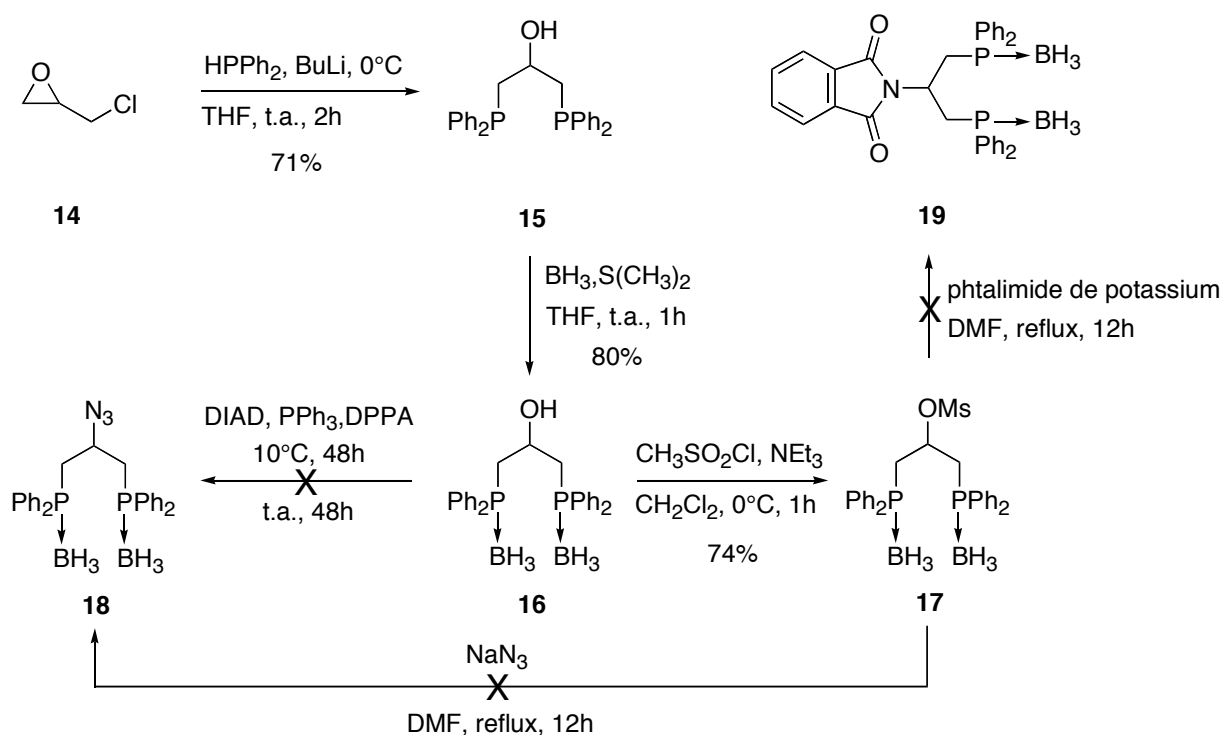


Figure 36. Synthèse des composés **15**, **16**, **17** à partir de l'épichlorohydrine **14**. Tentatives de préparations des composés **18** et **19**.

Le composé **16** résulte de la protection des groupements phosphino du composé **15** par BH_3 (80% rendement). La méthylation du groupement hydroxy par le chlorure de méthanesulfonyle conduit à la formation du composé **17** avec un rendement de 74% (Figure 36).

Le moyen le plus simple pour introduire un groupement amino à partir du composé **17** est de réaliser une substitution par l'azoture de sodium NaN_3 , puis de réduire le composé **18** en amine primaire par l'hydruide de lithium aluminium LiAlH_4 . L'essai de substitution nucléophile $\text{S}_\text{N}2$ du groupement mésylate du composé **17** a été réalisé avec 1,2 équivalent d'azoture de sodium dans le DMF à reflux pendant 12h (entrée 1, tableau 5). L'avancement de la réaction par RMN^{31}P montre une déprotection des groupements phosphino (disparition d'un large signal à 13 ppm) et la présence d'oxydes de phosphine ($\delta = 22.6$ et 33.9 ppm).

Entrées	Réactif	Conditions opératoires
1	17	NaN ₃ DMF, reflux, 2h
2	16	DIAD, PPh ₃ , ADDP, 10°C, 48h puis t.a., 48h
3	17	Phtalimide de potassium DMF, reflux, 12h

Tableau 5. Récapitulatif des conditions opératoires réalisées sur les réactifs de départ **16** et **17**.

Une seconde tentative pour l'obtention du composé **18** a été réalisée à partir du composé **16** en effectuant la réaction de Mitsunobu (entrée 2): le mécanisme supposé de la réaction est décrit ci-dessous (Figure 37).

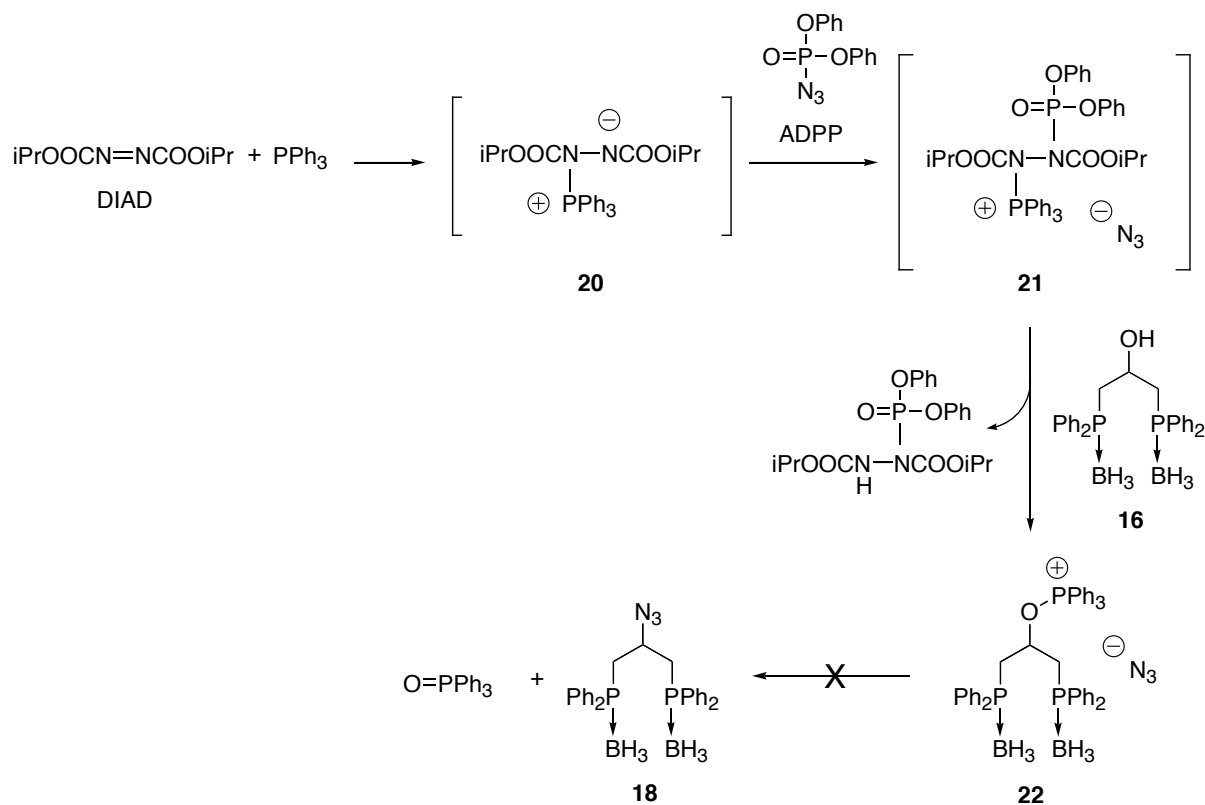


Figure 37. Réaction de Mitsunobu

La triphénylphosphine PPh_3 réagit avec le diisopropylazodicarbonate (DIAD) pour former une bétaine intermédiaire **20** qui réagit ensuite avec l'azoture de diphénylphosphoryle (ADPP) pour générer l'espèce intermédiaire **21**. L'ion oxyphosphonium **22** est obtenu après réaction du composé **16** avec l'intermédiaire **21**. L'attaque nucléophile de l'azoture sur l'ion oxyphosphonium génère l'oxyde de triphénylphosphine et le composé **18**. Cependant sous ces conditions opératoires, le composé **18** n'est pas obtenu. L'avancement de la réaction par RMN^{31}P montre la présence de 3 composés: l'azoture de diphénylphosphoryle (-9.3 ppm), le composé **16** (-13.3 ppm, large signal) et l'oxyde de triphénylphosphine (25.1 ppm). Ces trois composés ont été séparés par chromatographie sur colonne de silice (SiO_2) sous atmosphère inerte avec l'éluant toluène/acétate d'éthyle (7:3). La présence de l'azoture de diphénylphosphoryle ADPP semble indiquer que le mécanisme décrit précédemment n'a pas eu lieu. On peut supposer que l'oxyde de triphénylphosphine a été généré au tout début de la réaction et à inhiber la formation de la bétaine **20**.

Une troisième expérience a consisté à substituer le groupement mésylate du composé **17** par le phtalimide de potassium pour obtenir le composé **19** (entrée 3, tableau 5). L'objectif étant de faire réagir ensuite l'hydrazine pour obtenir l'amine primaire correspondante. L'avancement de la réaction montre la déprotection partielle des phosphines borées (oxydes à 20 ppm et 26 ppm). Deux larges signaux à 10 ppm et 14 ppm signalent la présence de composés phosphorés protégés par BH_3 . De nombreux signaux apparaissent de -10 à -32 ppm. Après chromatographie sur colonne de silice sous atmosphère inerte (éluant cyclohexane/acétate d'éthyle 19:1), le produit d'élimination **23** est obtenu avec un faible rendement de 17% (RMN^1H : \square = 6.10 (m, 1H, H éthylénique), 6.30 (m, 1H, H éthylénique)) (Figure 38). La mauvaise résolution du spectre RMN^1H ne permet pas de déterminer les

constantes de couplage des protons éthyléniques et donc de connaître la conformation (*Z*) ou (*E*) du composé **23**.

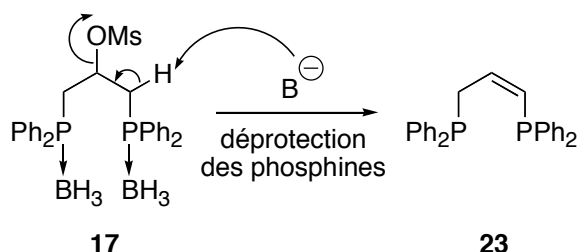


Figure 38. Mécanisme d'élimination pour l'obtention de composé **23**.

On observe lors de ces expériences (entrées 1 et 3, tableau 5), la déprotection partielle ou totale des phosphines borées. Ce résultat n'est pas trop surprenant puisque la déprotection peut avoir lieu en milieu basique (dans notre cas NaN₃ ou phtalimide de potassium)⁹³. Cependant, dans le cas de l'expérience faisant intervenir la réaction de Mitsunobu (entrée 2), on observe aucune déprotection des phosphines, ce qui semble indiquer que l'ion azoture n'a pas été généré en solution. Cette observation semble confirmer le fait que la réaction de Mitsunobu n'a pas eu lieu.

Les prochaines expériences ont consisté à préparer directement le ligand biotinylé diphosphine en faisant réagir sur la (+)-Biotine ou son ester activé **24** (Figure 39) les composés **14** et **15** (Tableau 6).

1) Nous avons tenté le couplage de l'alcool diphosphine **15** sur la (+)-Biotine activée *in situ* par le DCC (dicyclohexylcarbodiimide) (entrée 1, tableau 6). L'avancement de la réaction par RMN³¹P montre la présence du produit de départ **15** (signal intense à -22,6 ppm) et un faible signal à -21,7 ppm (10% par rapport au signal à -22.6 ppm).

Entrées	Réactif	Conditions opératoires
1	15	(+)-Biotine, DDC/DMAP DMF 0°C, puis t.a., 24h
2	15	24 , DMAP CH ₂ Cl ₂ , t.a., 24h
3	14	24 , HPPPh ₂ /BuLi THF, t.a., 2 jours

Tableau 6. Récapitulatif des conditions opératoires réalisées sur les réactifs de départ **14** et **15**.

2) Afin d'optimiser le protocole opératoire précédent, l'ester activé de la (+)-Biotine **24** a été préparé selon la méthode décrite par C. Somlai⁹⁷ (Figure 39). Cela permet d'éviter l'activation *in situ* de la (+)-Biotine et de faire réagir directement le composé **24** sur l'alcool diphosphine **15** (entrée 2). Cependant aucune réactivité n'est observée au bout de 24h, on remarque par RMN³¹P la présence unique du composé **15** non réagi (signal à -22.4 ppm).

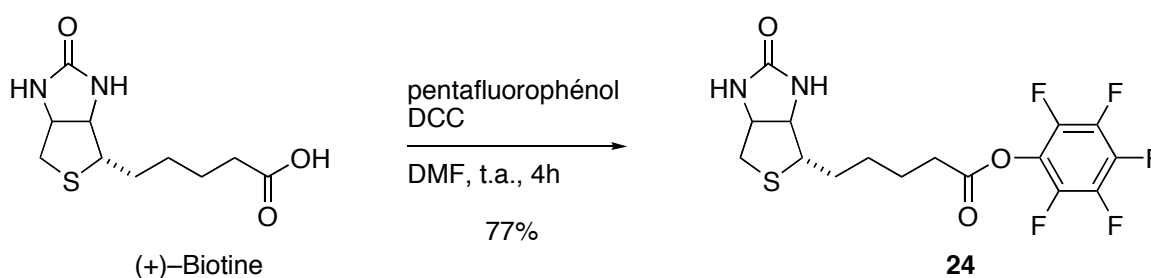


Figure 39. Préparation de l'ester activé de la (+)-Biotine **24**.

3) La dernière expérience a consisté à former *in situ* le composé **15** à partir de l'épichlorohydrine **14** et LiPPh₂ et de le faire réagir sur l'ester activé de la (+)-Biotine **24** (entrée 3). Aucune réactivité n'est observée au bout de 2 jours (présence du composé **15** à -22.6 ppm).

La première méthode d'activation de la (+)-Biotine *in situ* par le DCC (entrée 1, tableau 6) semble néanmoins meilleure que l'utilisation du composé **24** (entrées 2 et 3). Un composé phosphoré se forme (signal à -21.7 ppm) à température ambiante. Il serait alors judicieux de voir l'évolution de la réaction en chauffant progressivement le mélange réactionnel afin d'obtenir le composé phosphoré en plus grande quantité et de le purifier sur colonne de silice sous atmosphère inerte. Cette même réaction pourrait être effectuée en utilisant un autre ester activé de la biotine: la (+)-Biotine *N*-hydroxysuccinimide **5**.

II.2.3. Préparation du ligand Biot-2 sans espaceur

Après ces précédents échecs, notre attention s'est portée sur une amine exocyclique diphosphine H-2 préparée par Liu en 1992⁹⁸. Les rendements indiqués sur le schéma réactionnel ci-dessous (Figure 40) sont ceux obtenus lors de la reproduction du protocole opératoire:

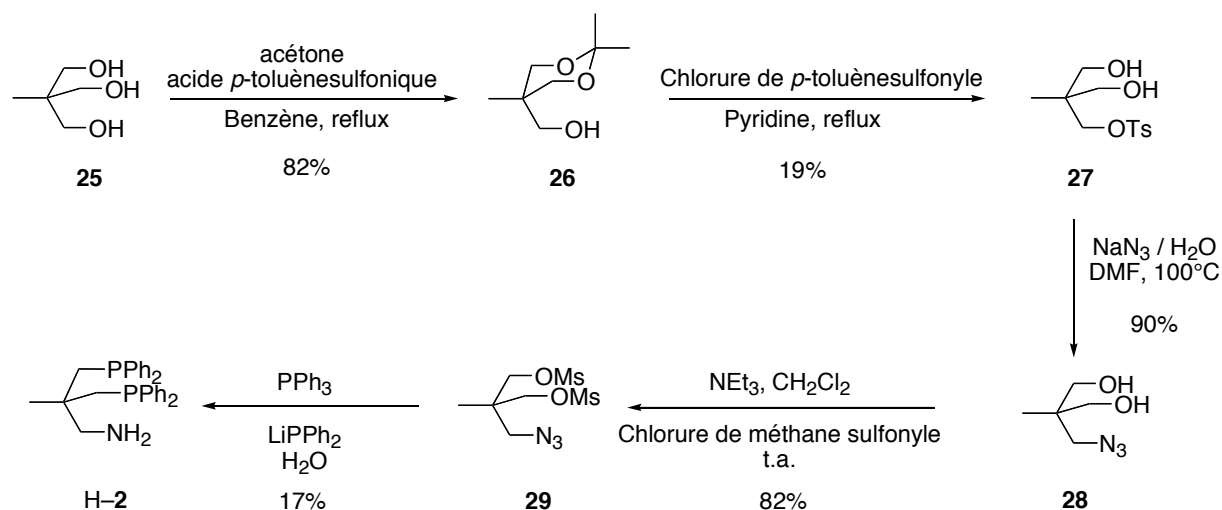


Figure 40. Schéma réactionnel de la préparation de l'amine diphosphine H-2.

La protection des deux groupements hydroxy du 1,1,1-Tris(hydroxyméthyle)éthane **25** par l'acétone conduit à la formation de l'acétal **26** avec un bon rendement de 82%⁹⁹. Lors de

l'étape de tosylation du composé **26**, on observe la déprotection inattendue de l'acétal. Le diol **27** est obtenu avec 19% de rendement. Etant donné que le milieu réactionnel devient acide (formation de HCl pendant la réaction) et que le mélange est porté à reflux pendant 3h (au lieu de 30 minutes dans le protocole opératoire original), la déprotection de l'acétal est favorisée sous ces conditions opératoires. La substitution nucléophile du composé **27** par l'azoture de sodium dans le DMF conduit au composé **28** avec un bon rendement de 90%. Sa méthylation par le chlorure de méthanesulfonyle permet d'obtenir le composé **29** avec un rendement de 82%. Lors de la dernière étape de préparation du ligand H-2, un intermédiaire réactionnel est formé *in situ*. Le groupement iminophosphorane est obtenu par réaction de Staudinger entre l'azoture du composé **29** et la triphénylphosphine (Figure 41): l'intermédiaire **30** résulte de l'attaque nucléophile de l'iminophosphorane sur le carbone adjacent. L'ouverture du cycle s'effectue ensuite par l'attaque nucléophile du phosphore sur le carbone en β de l'azote, le second équivalent se substituant au mésylate.

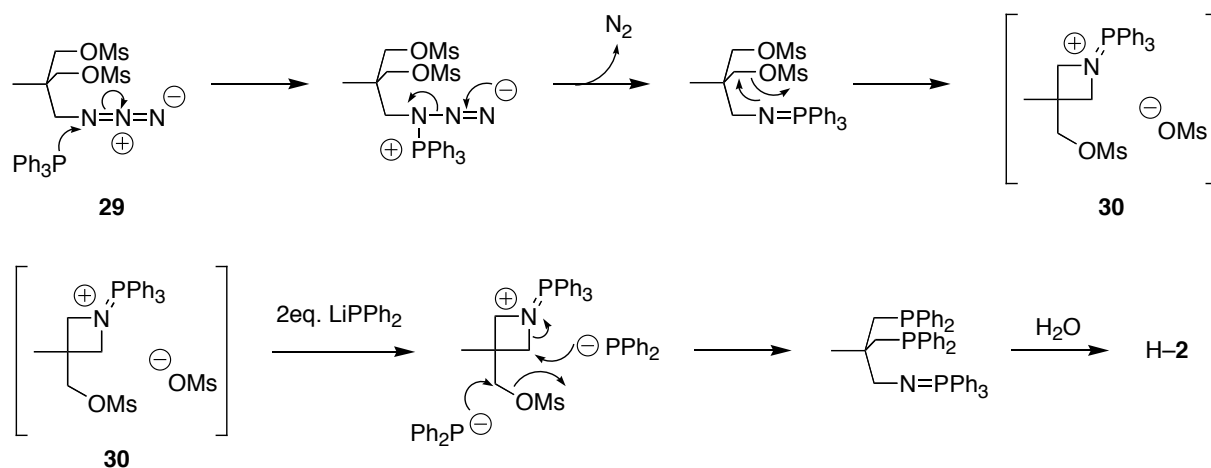


Figure 41. Réaction de Staudinger: formation de l'intermédiaire **30**.

Le faible rendement du ligand H-2 (17%) s'explique par son oxydation lors de sa purification sur colonne de silice (SiO_2). Le ligand biotinylé **Biot-2** est obtenu en suivant le protocole opératoire de la synthèse du ligand **Biot-1**, c'est à dire par couplage entre l'ester activé de la

(+)-biotine **5** et l'amine diphosphine H-2 (Figure 42). Ce procédé permet d'obtenir le ligand biotinylé **Biot-2** avec un rendement de 69 %.

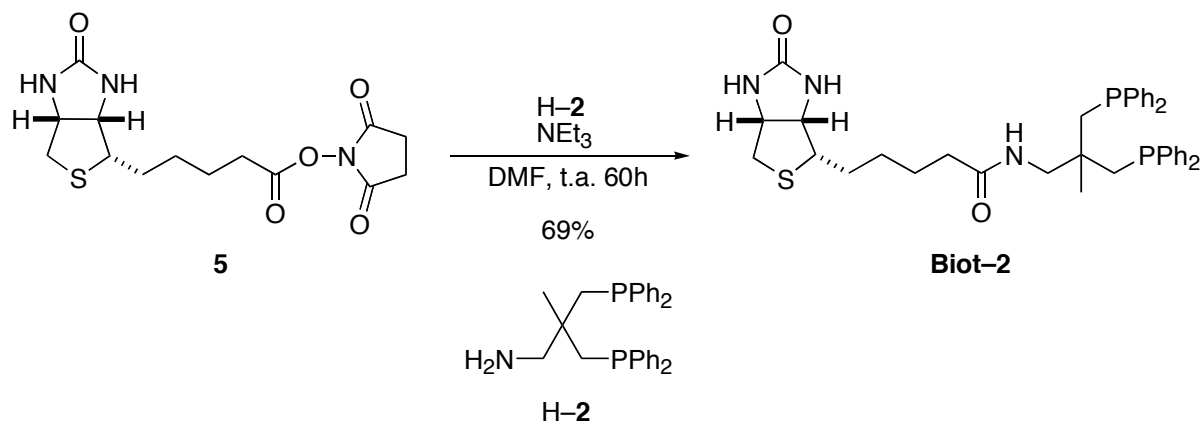


Figure 42. Synthèse du ligand biotinylé **Biot-2**.

II.2.4. Préparation des ligands avec espaceurs

Le procédé de préparation des ligands avec espaceurs repose sur l'incorporation d'un espaceur achiral entre la biotine et le groupement aminodiphosphine (Figure 43). Cela a pour effet de faire varier la position du ligand bidenté dans la cavité chirale de la protéine. Le moyen le plus simple est d'utiliser des acides aminés comme espaceurs. Ces composés utilisés dans ce travail sont commerciaux et peu coûteux.

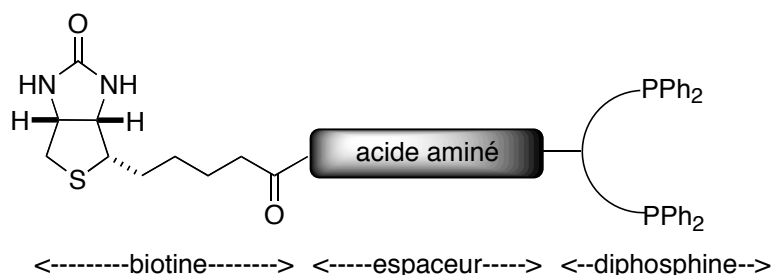


Figure 43. Représentation schématique d'un ligand diphosphine avec un acide aminé comme espaceur.

La première étape consiste à préparer des précurseurs acides aminés biotinylés par couplage peptidique entre la biotine et divers acides aminés.

II.2.4.1. Préparation des précurseurs acides aminés biotinylés

La technique de couplage retenue fut celle de Redeuilh pour l'élaboration des précurseurs acides aminés biotinylés¹⁰⁰. Le principal avantage de cette méthode est de s'affranchir de la préparation de l'ester activé de la biotine^{101,102}. La technique consiste à coupler directement l'acide aminé désiré sur la biotine activée *in situ* à l'aide de l'isobutylchloroformate. Cette méthode de couplage est à l'origine de la préparation de tous les précurseurs acides aminés biotinylés **Biot-3ⁿ** et **Biot-4^q** résultant du couplage peptidique entre des acides aminés aliphatiques (**3ⁿ**) (n = 1-7) et aromatiques (**4^q**) (q = *ortho*-, *méta*-, *para*-) avec la biotine (**BiotOH**) (Figure 44).

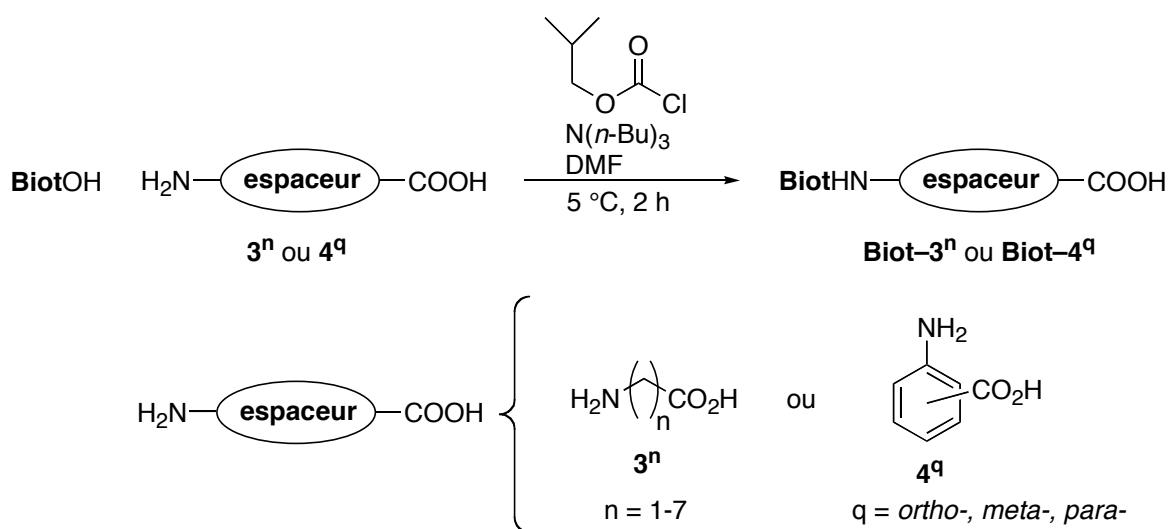


Figure 44. Synthèse des précurseurs acides aminés biotinylés par incorporation d'acides aminés aliphatiques (**3ⁿ**) (n = 1-7) et aromatiques (**4^q**) (q = *ortho*-, *méta*-, *para*-) par couplage peptidique.

Le mécanisme de formation des précurseurs acides aminés biotinylés est représenté sur le schéma ci-dessous (Figure 45). L'ester activé de la biotine **31** est obtenu par réaction entre le groupement carboxylate de la biotine (généralisé par traitement de la biotine avec $N(n\text{Bu})_3$) et l'isobutylchloroformate. Cette espèce réagit ensuite avec les espaceurs acides aminés aliphatiques **3ⁿ** ($n = 1-7$) et aromatiques **4^q** ($q = \textit{ortho-}, \textit{méta-}, \textit{para-}$) pour obtenir après dégagement de dioxyde de carbone CO_2 et formation d'isobutanol les précurseurs acides aminés biotinylés **Biot-3ⁿ** et **Biot-4^q**.

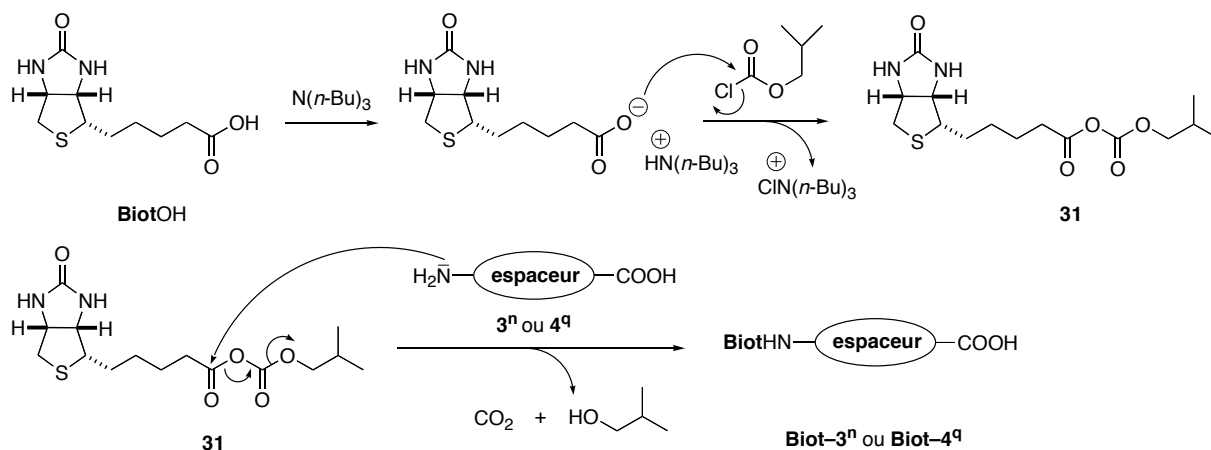


Figure 45. Mécanisme de formation des précurseurs acides aminés biotinylés **Biot-3ⁿ** et **Biot-4^q**.

Les rendements obtenus sont bons, jusqu'à 81% (Tableau 7). Deux exceptions sont cependant observées pour la préparation des composés **Biot-3³** et **Biot-3⁷**. Les rendements sont respectivement de 53% et 44% (entrées 3 et 7). Ce protocole opératoire est une technique de choix pour le couplage d'acides aminés aliphatiques et aromatiques sur la biotine. Aucune chromatographie est nécessaire pour la purification de ces composés. Ces derniers sont obtenus simplement par leur précipitation dans l'éthanol aqueux (1:1) après acidification par HCl à pH 2.

Entrées	Précurseurs aminobiotinylés	Rendements (%)
1	Biot-3¹	81
2	Biot-3²	81
3	Biot-3³	53
4	Biot-3⁴	73
5	Biot-3⁵	75
6	Biot-3⁶	75
7	Biot-3⁷	44
8	Biot-4^{ortho}	65
9	Biot-4^{méta}	70
10	Biot-4^{para}	74

Tableau 7. Rendements obtenus pour la préparation des précurseurs acides aminés biotinylés **Biot-3ⁿ** (n = 1–7) et **Biot-4^q** (q = *ortho*-, *méta*-, *para*-).

II.2.4.2. Technique de couplage entre les précurseurs acides aminés biotinylés et l'aminodiphosphine (H-1 ou H-2)

Nos efforts se sont portés sur l'élaboration du couplage peptidique entre l'aminodiphosphine H-1 ou H-2 et le précurseur acide aminé biotinylé où la préparation du ligand s'effectue par activation *in situ* du groupement acide carboxylique. Notre attention s'est portée sur les travaux réalisés par Garrett sur les couplages peptidiques utilisant le 2-chloro-4,6-diméthoxy-1,3,5-triazine (CDMT) comme agent de couplage¹⁰³ (Figure 46).

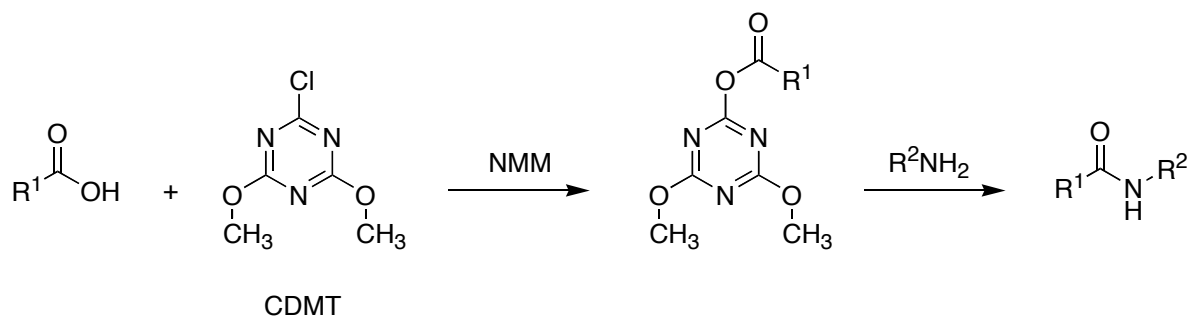


Figure 46. Couplage peptidique par l'utilisation du CDMT.

Le CDMT est un composé stable, cristallin, avec une bonne solubilité dans les solvants organiques. L'attrait majeur de cette méthode de synthèse réside dans la purification des composés. Ces derniers s'obtiennent par leur précipitation dans l'acétonitrile par l'addition d'eau. Ce protocole opératoire a donc été utilisé pour la préparation des ligands biotinylés avec espaceurs amino-acides.

II.2.4.2.1. Préparation des ligands de type Biot-3ⁿ-1 avec espaceurs aliphatiques 3ⁿ (n = 1-7)

Le principe repose sur l'activation *in situ* par le CDMT du précurseur acide aminé biotinylé **Biot-3ⁿ** où l'espaceur est un acide aminé aliphatique. La formation de la liaison amide résulte du couplage entre le précurseur activé et l'aminodiphosphine **H-1** (Figure 47).

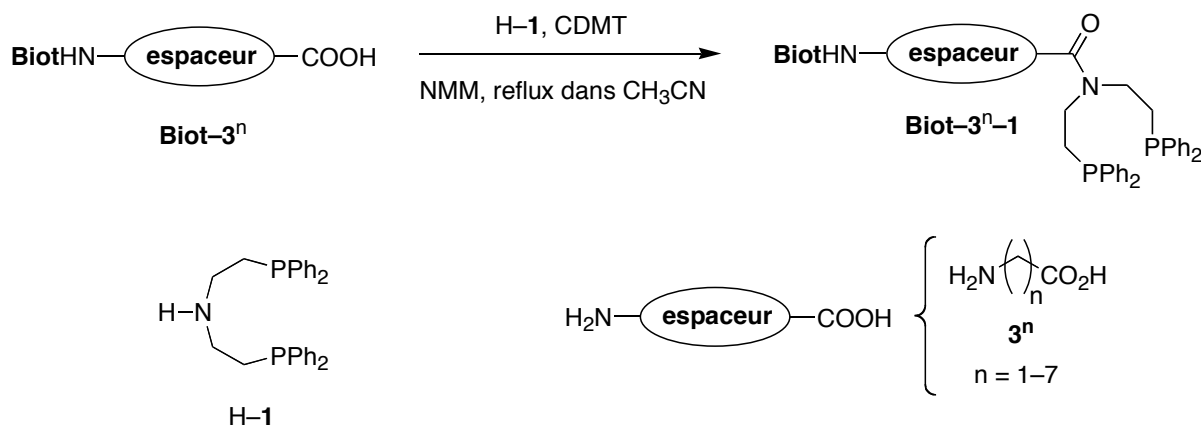


Figure 47. Synthèse de ligands diphosphine biotinylés aliphatiques **Biot-3ⁿ-1** (n = 1-7).

Les rendements obtenus (Tableau 8) sont modestes. Ceci est dû à la faible solubilité des composés biotinylés dans l'acétonitrile et à la difficulté de purifier ces produits par chromatographie sur colonne de silice (SiO₂).

Entrées	Ligands biotinylés	Rendements (%)
1	Biot-3¹-1	54
2	Biot-3²-1	32
3	Biot-3³-1	64
4	Biot-3⁴-1	34
5	Biot-3⁵-1	29
6	Biot-3⁶-1	36
7	Biot-3⁷-1	17

Tableau 8. Rendements obtenus pour la préparation de ligands diphosphines aminobiotinylés aliphatiques **Biot-3ⁿ-1** (n = 1-7).

II.2.4.2.2. Préparation des ligands de type **Biot-4^q-1** avec espaceurs aromatiques **4^q** (q = *ortho*-, *méta*-, *para*-)

Le protocole opératoire est identique au précédent. Le précurseur acide aminé biotinylé aliphatique **Biot-3ⁿ** est remplacé par un précurseur acide aminé biotinylé **Biot-4^q** où l'espaceur est un acide aminé aromatique **4^q** (q = *ortho*-, *méta*-, *para*-) (Figure 48):

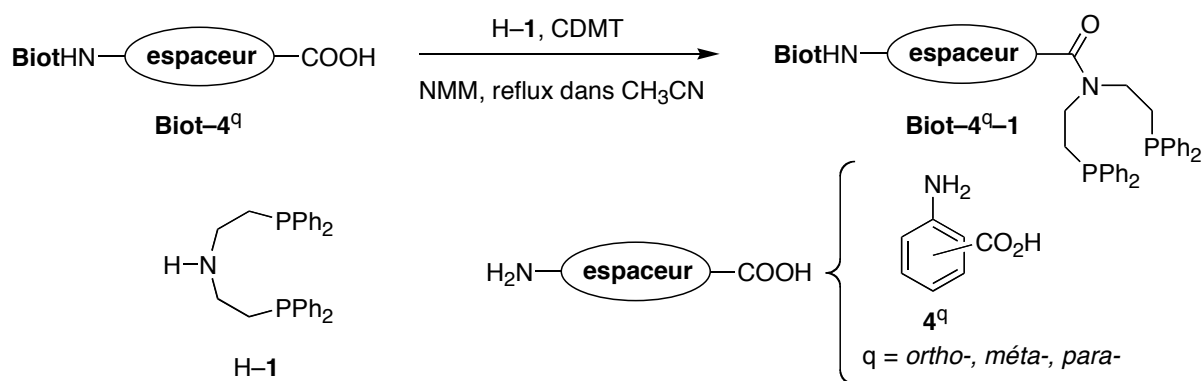


Figure 48. Synthèse de ligands diphosphines biotinylés aromatiques **Biot-4^q-1** (q = *ortho*-, *méta*-, *para*-).

Il est impossible d'obtenir le ligand **Biot-4^{ortho}-1** pur (entrée 1, tableau 9). En effet, après chromatographie sur colonne de silice, un mélange de composés est obtenu: les ligands **Biot-4^{ortho}-1** et **Biot-1**. Ces deux ligands sont très difficiles à séparer par chromatographie (les R_f sont très proches). S'il reste des traces de biotine dans le composé de départ **Biot-4^{ortho}**, alors l'amine H-1 réagit sur l'ester activé de la biotine par le CDMT générant ainsi le ligand indésirable **Biot-1**. En effectuant une nouvelle synthèse du ligand **Biot-4^{ortho}-1** avec le réactif de départ **Biot-4^{ortho}** purifié sur colonne de silice (au lieu d'être obtenu par recristallisation) pour ne plus avoir de trace de biotine, on observe toujours la formation des deux ligands.

Entrées	Ligands biotinylés	Rendements (%)
1	Biot-4^{ortho}-1	-
2	Biot-4^{méta}-1	29
3	Biot-4^{para}-1	61

Tableau 9. Rendements obtenus pour la préparation de ligands diphosphine biotinylés aromatiques **Biot-4^q-1** (q = *méta*-, *para*-).

Lors de l'activation de l'acide carboxylique d'un composé possédant également une fonction amide, l'intermédiaire réactionnel est le composé cyclique **33** et non l'ester activé par le CDMT (composé **32**)¹⁰³. Le précurseur acide aminé biotinylé **Biot-4^{ortho}** peut générer alors après son activation par le CDMT le composé cyclique **33** (Figure 49).

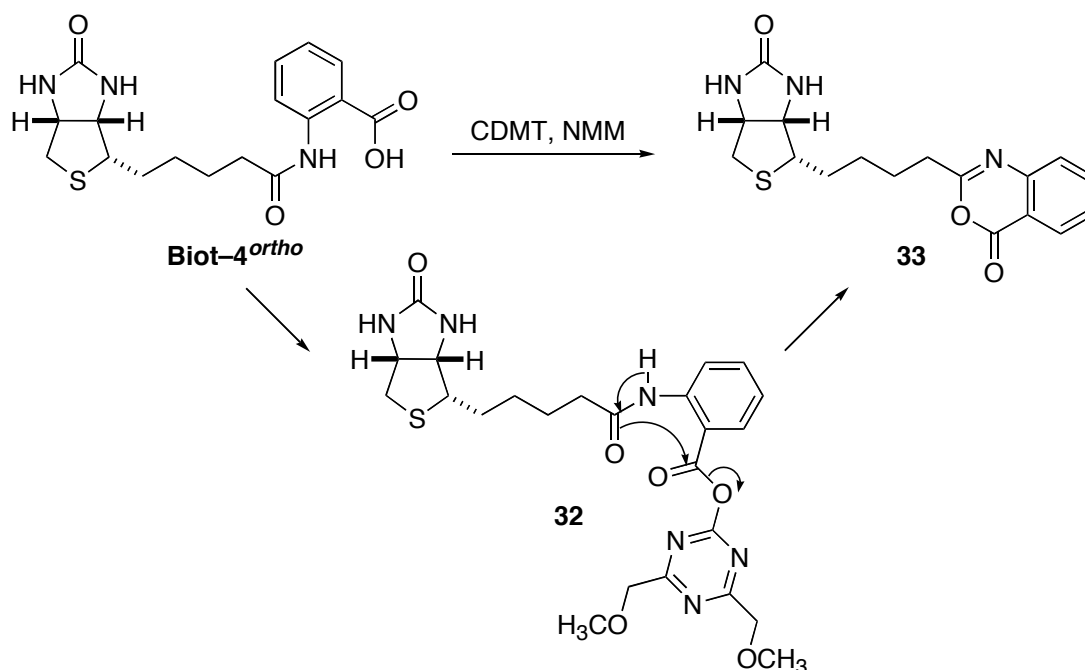


Figure 49. Mécanisme de formation du composé **33** à partir du ligand **Biot-4^{ortho}** activé par le CDMT.

L'attaque nucléophile de l'aminodiphosphine **H-1** sur le carbonyle du cycle **33** génère le ligand **Biot-4^{ortho}-1** attendu selon le mécanisme suivant (Figure 50).

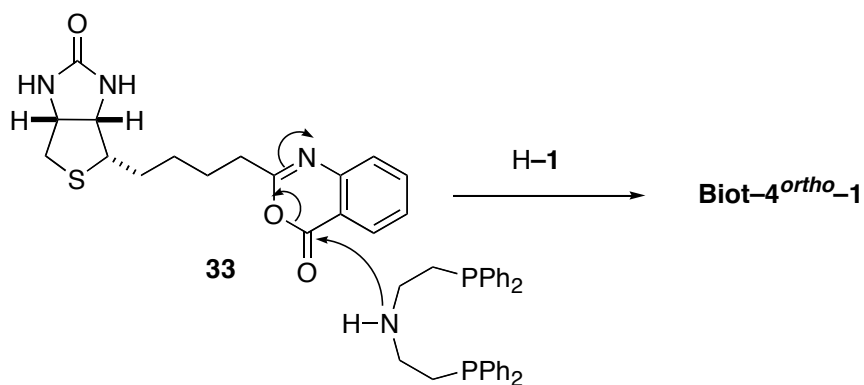


Figure 50. Mécanisme de formation du ligand **Biot-4^{ortho}-1**.

La formation du ligand **Biot-1** pourrait résulter de l'attaque nucléophile de l'aminodiphosphine **H-1** sur le carbone de la fonction formimide du composé **33**, générant

l'espèce **34**. L'hydrolyse de ce composé peut produire deux espèces: le ligand **Biot-1** et l'acide anthranilique **4^{ortho}** (Figure 51).

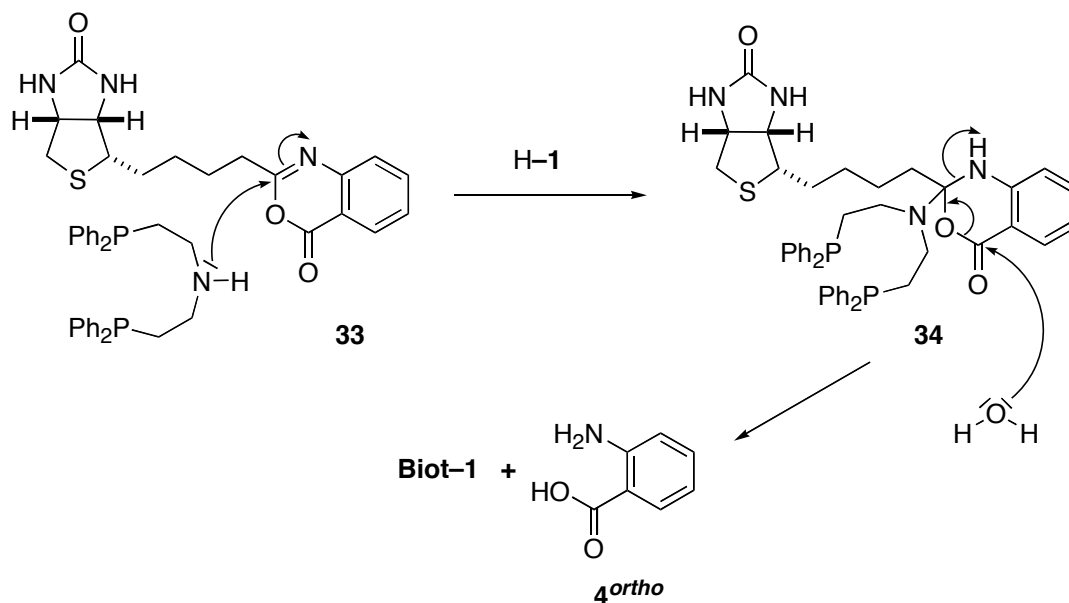


Figure 51. Proposition d'un mécanisme réactionnel pour la formation du ligand **Biot-1** à partir du composé **33**.

Dans le cas de la préparation des ligands biotinylés **Biot-4^{méta}-1** et **Biot-4^{para}-1**, aucune formation du ligand **Biot-1** n'est observée. La position du groupement carboxylique en méta et para de la chaîne biotinylée des composés **Biot-4^{méta}** et **Biot-4^{para}** empêche la formation du cycle. La formation du ligand **Biot-1** ne peut avoir lieu. Cependant lors de la préparation des ligand **Biot-3ⁿ-1** où $n \geq 1$, le composé **Biot-1** se forme (les espèces peuvent néanmoins être séparées par chromatographie, leurs R_f étant différents).

Afin d'éviter la formation du composé **Biot-1** lors de la préparation du ligand **Biot-4^{ortho}-1**, une synthèse "inverse" de ce ligand a été réalisée. Elle s'effectue en deux étapes:

1) La première étape consiste à coupler le ligand H-1 sur l'acide anthranilique 4^{ortho} par couplage peptidique (Figure 52). Etant donné que le composé 4^{ortho} ne possède pas de fonction amide, la formation du cycle ne peut avoir lieu. L'attaque nucléophile s'effectue uniquement sur le carbonyle de l'acide anthranilique activé par le CDMT générant ainsi l'intermédiaire 2-amino-*N,N*-bis-(2-diphénylphosphanyl-éthyl)-benzamide) (4^{ortho} -1).

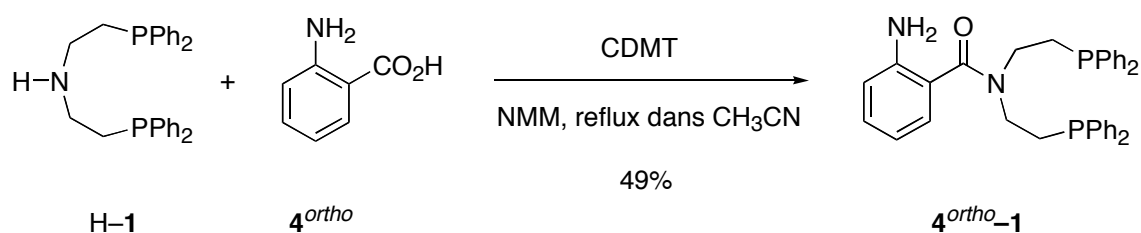


Figure 52. Synthèse du ligand 4^{ortho} -1.

2) Le composé intermédiaire isolé par chromatographie sur silice est ensuite couplé sur la (+)-Biotine activée par le CDMT (Figure 53). Cette nouvelle méthode de synthèse permet d'obtenir le composé **Biot- 4^{ortho} -1** pur avec un rendement de 43%. Lors de cette étape, aucune formation du ligand **Biot-1** n'est observée.

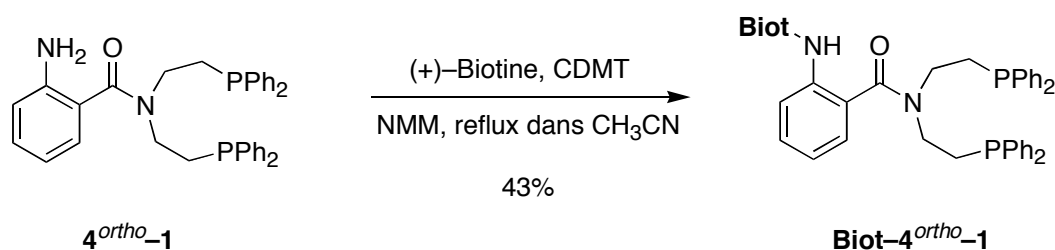


Figure 53. Synthèse du ligand **Biot- 4^{ortho} -1**.

II.2.4.2.3. Préparation des ligands de type **Biot-3ⁿ-2** avec espaceurs aliphatiques 3ⁿ (n = 1-7)

La préparation des ligands **Biot-3ⁿ-2** est identique à la préparation des ligands **Biot-3ⁿ-1**.

L'aminodiphosphine **H-2** remplace le ligand **H-1** (Figure 54).

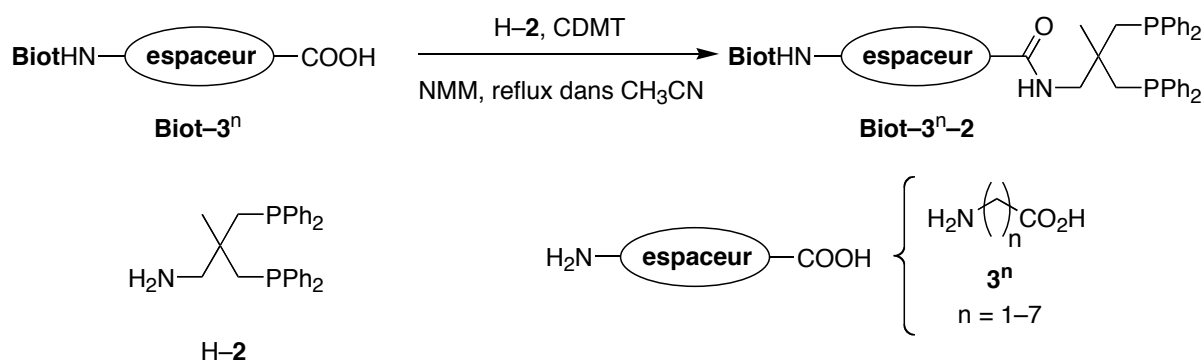


Figure 54. Synthèse de ligands diphosphines aminobiotinylés aliphatiques **Biot-3ⁿ-2** (n = 1-7).

Les rendements obtenus lors de ces couplages par le CDMT sont assez modestes (Tableau 10). La solubilité des composés semble être un problème majeur pour la préparation des ligands (entrées 4-7, tableau 10).

Entrées	Ligands biotinylés	Rendements (%)
1	Biot-3²-2	50
2	Biot-3²-2	38
3	Biot-3³-2	49
4	Biot-3⁴-2	20
5	Biot-3⁵-2	29
6	Biot-3⁶-2	26
7	Biot-3⁷-2	24

Tableau 10. Rendements obtenus pour la préparation de ligands diphosphines aminobiotinylés aliphatiques **Biot-3ⁿ-2** (n = 1-7).

Les différents avancements de la réaction par RMN ^{31}P montrent toujours la présence du ligand H-2 qui n'a pas réagi. Des difficultés ont été rencontrées lors de la purification de ces composés, leurs R_f étant très proches quel que soit le type d'éluant utilisé pour la chromatographie sur silice.

II.2.4.2.4. Préparation des ligands de type Biot-4^q-2 avec espaceurs aromatiques 4^q (q = *ortho*-, *méta*-, *para*-)

La préparation des ligands **Biot-4^q-2** est identique à la préparation des ligands **Biot-4^q-1** où les espaceurs sont des acides aminés aromatiques 4^q (q = *ortho*-, *méta*-, *para*). L'aminodiphosphine H-2 remplace le ligand H-1 (Figure 55).

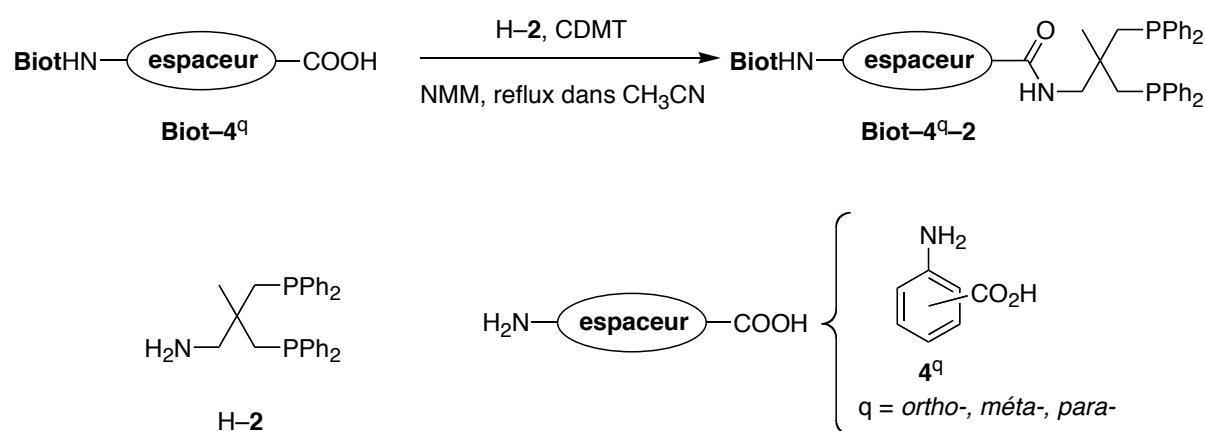


Figure 55. Synthèse de ligands diphosphine aminobiotinylés aromatiques **Biot-4^q-2** (q = *ortho*-, *méta*-, *para*-).

Dans le cas de la préparation de ligand **Biot-4^{ortho}-2**, le rendement est de 21% (entrée 1, tableau 11). Lors de la purification de ce composé sur colonne de silice (SiO_2), le ligand sans espaceur **Biot-2** a été cependant isolé. L'explication pour la formation du ligand **Biot-2** est la même que celle décrite précédemment pour le ligand **Biot-1** (cf Figure 51).

Entrées	Ligands biotinylés	Rendements (%)
1	Biot-4^{ortho}-2	21
2	Biot-4^{méta}-2	22
3	Biot-4^{para}-2	24

Tableau 11. Rendements obtenus pour la préparation de ligands diphosphines aminobiotinylés aromatiques **Biot-4^q-1** (q = *ortho*-, *méta*-, *para*-).

II.3. Etude de l'hydrogénation énantiosélective de l'acide α -acétamidoacrylique par des métalloenzymes artificielles

II.3.1. Préambule

Une étape importante pour l'utilisation des métalloenzymes artificielles en catalyse réside dans la détermination du nombre de sites actifs des protéines (avidine, streptavidine). La méthode de quantification des sites actifs ainsi le système d'hydrogénation qui a été élaboré pour réaliser cette étude seront décrits dans ce préambule.

II.3.1.1. Le principe de quantification de la protéine: Le cas de l'avidine

La quantification de la protéine, nécessaire à la détermination du nombre de sites actifs, est réalisée par fluorimétrie¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Cette méthode est bon marché, simple et rapide.

Le tracé de la courbe de titrage fluorimétrique de l'avidine (Figure 56) décrit une augmentation de la fluorescence lorsque la quantité de biotine-4-fluorescéine ajoutée est supérieure au nombre de sites actifs de la protéine. Lorsque cette molécule biotinylée

(possédant un groupement fluorophore) se fixe aux sites actifs de l'avidine, sa fluorescence est "quenchée" et transférée aux résidus fluorophores présents dans chaque site actif (tryptophanes). Dès que les sites de la protéine sont saturés en biotine-4-fluorescéine (point d'inflexion de la courbe), une augmentation plus prononcée de la fluorescence est alors observée.

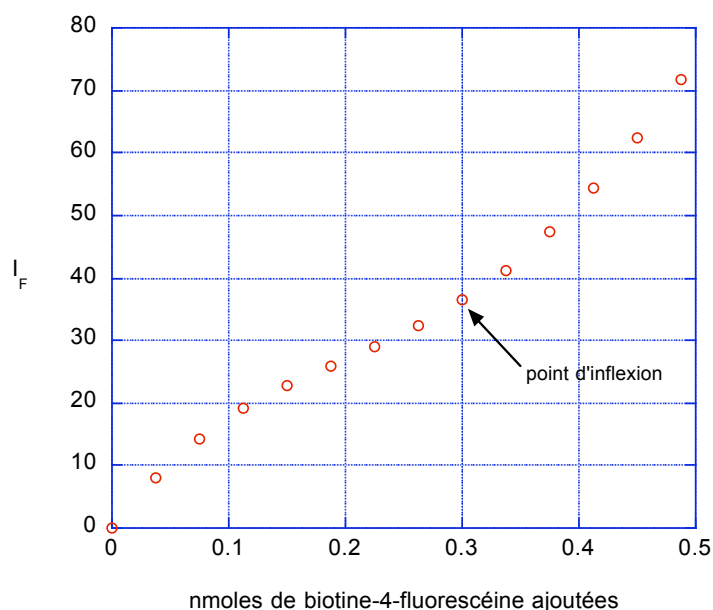


Figure 56. Courbe de titrage fluorimétrique de l'avidine.

L'équation suivante permet de déterminer l'activité de la protéine (Equation 1):

$$\text{Activité de la protéine (\%)} = \frac{n_{\text{eq}}}{4 \cdot V_T \cdot C_i} \times 100 \quad \text{équation 1}$$

où C_i = concentration initiale de protéine (mole/L), V_T = volume total de la solution (L), n_{eq} = nmoles de biotine-4-fluorescéine ajoutées à l'équivalence (mole).

Deux méthodes peuvent être utilisées pour déterminer la concentration initiale de la protéine C_i :

Méthode 1: La concentration initiale de protéine est déterminée après avoir pesé une quantité définie de protéine considérée comme 100% active. Le poids moléculaire de la protéine possédant 4 sites actifs est de 65000 g/mol (valeur théorique). Cette valeur permet de déterminer la concentration initiale de protéine C_i pour un volume de solution donné.

Méthode 2: La densité optique (D.O.) de la solution de protéine à titrer est mesurée (le coefficient d'extinction molaire ϵ est de 113920 M⁻¹ cm⁻¹ pour l'avidine à une longueur d'onde de 280 nm). L'expression $D.O. = C_i \cdot l \cdot \epsilon$ permet de déterminer la concentration initiale de protéine C_i (où l = longueur de la cuve en cm).

Pour la détermination de l'activité de la protéine et du nombre de sites actifs, la première méthode de détermination de la concentration initiale de protéine C_i a été systématiquement utilisée. Les solutions stocks de protéine pour l'élaboration des catalyses sont obtenues après avoir pesé la protéine. Le poids moléculaire de la protéine est ensuite adapté au nombre exact de sites actifs (voir explications ci-dessous).

Au point d'inflexion (ou point d'équivalence) la molarité de la protéine active est calculée. Elle correspond au nombre de mole de biotine-4-fluorescéine ajoutée (n_{eq}) (dans ce cas précis 318.75 μ mole, cf Figure 56) divisée par le chiffre 4 (nombre de sites actifs pour une protéine 100% active), divisée par le volume total de la solution V_T (50 μ L). La molarité est de 1.59 μ M. Le nombre de site actif est ensuite déterminé en fonction de l'activité théorique de la protéine. Cette dernière correspond à la molarité mesurée (1.59 μ M) divisée par la

concentration initiale C_i de la solution de protéine considérée comme 100% active ($2.06 \mu\text{M}$) multipliée par 100. L'activité expérimentale de l'avidine est de 77.4% ce qui correspond à un nombre de sites actifs de 3.09.

Le titrage fluorimétrique de l'avidine montre que la protéine n'est pas 100% active (seulement 3.09 sites actifs sur 4). La perte partielle de l'activité de la protéine a lieu lors d'une des étapes de purification de la protéine: la dénaturation. Sous conditions dénaturantes (solution de chlorure de guanidinium, 6M, pH 1.5), la protéine se trouve dans un sac à dialyse dont les pores ont une taille permettant à des molécules de poids moléculaire inférieur à 6000-8000 g/mol (sucres, acides gras, acides nucléiques digérés...) de diffuser à travers la membrane. Cette étape de dialyse permet surtout d'éliminer la biotine ($M = 244 \text{ g/mol}$) présente dans le milieu bactérien lors de la culture. Etant donné que la protéine dénaturée ne possède plus de sites actifs, la biotine ne pouvant plus s'y fixer est éliminée par diffusion. Cependant, lors de cette étape de purification, l'élimination de la biotine du sac de dialyse n'est pas totale. On peut également émettre l'hypothèse que lors de la renaturation de la protéine (solution de Tris, 20 mM, pH 7.4), la topographie des sites actifs peut être modifiée. Après purification sur colonne d'affinité d'iminobiotine et lyophilisation, la protéine dont les sites sont partiellement contaminés par la biotine ou atrophiés, possède alors moins de 4 sites actifs.

Lors des expériences de catalyse, le poids moléculaire de la protéine est adapté au nombre de sites actifs déterminés par la quantification de façon à avoir 4 sites actifs par mole de protéine. Par exemple, dans le cas de l'avidine ayant un nombre de 3.09 sites actifs, le poids moléculaire de la protéine (utilisé pour les expériences) est 65000 g/mol (le poids moléculaire théorique) divisé par 3,09 (nombre de sites déterminés expérimentalement) et multiplié par 4 (nombre de sites théoriques). On obtient alors un poids moléculaire qui vaut 84142.4 g/mol.

II.3.1.2. Le procédé d'hydrogénation

II.3.1.2.1. La méthode de dégazage des solutions

L'absence d'oxygène dans les solutions de catalyse est un facteur important. Elle évite la dégradation du complexe lors de la catalyse. Deux méthodes peuvent être utilisées à cet effet:

1) La technique du *Freeze-Pump-Thaw*: cette technique permet d'éliminer l'oxygène résiduel présent dans une solution. Son élimination s'effectue par des cycles successifs 1) congélation de la solution 2) application du vide 3) décongélation. Cette opération est effectuée trois fois de suite. Cependant cette technique est contraignante. En effet, elle nécessite une verrerie résistante à très basse température et étanche au vide.

2) La technique du barbotage à l'azote: Ce procédé repose sur l'introduction d'un fin tuyau en téflon dans la solution, connecté à une arrivée d'azote. Le dégazage par barbotage à l'azote dure trois heures au minimum. Cette technique beaucoup moins contraignante que celle décrite précédemment est systématiquement utilisée pour dégazer chaque solution.

II.3.1.2.2. Le système d'hydrogénation

L'expérience de catalyse est réalisée dans un tube en verre d'une contenance de 3 mL. Le schéma ci-dessous (Figure 57) représente un tube de catalyse avec les différentes solutions de substrat, de protéine (avidine) et de complexe:



Figure 57. Représentation d'un tube de catalyse.

Ce tube est positionné sous atmosphère inerte (boîte à gants) dans un portoir en téflon composé de 3 étages pouvant accepter chacun 7 tubes. Ce portoir est placé dans une autoclave en verre pouvant résister à des pressions inférieures à 10 bar (Figure 58). Ce dispositif est connecté à une réserve d'hydrogène muni d'un manomètre. Le dispositif est placé sur un plateau pouvant réaliser des mouvement orbitales. Afin d'optimiser l'agitation et permettre ainsi une meilleure homogénéisation de la solution, une bille en verre est placée dans chaque tube. Trois autoclaves de ce type sont disponibles au laboratoire dont un possédant un système thermostaté permettant ainsi de réaliser des catalyses à basses et hautes températures. Vingt et une catalyses peuvent être effectuées simultanément.

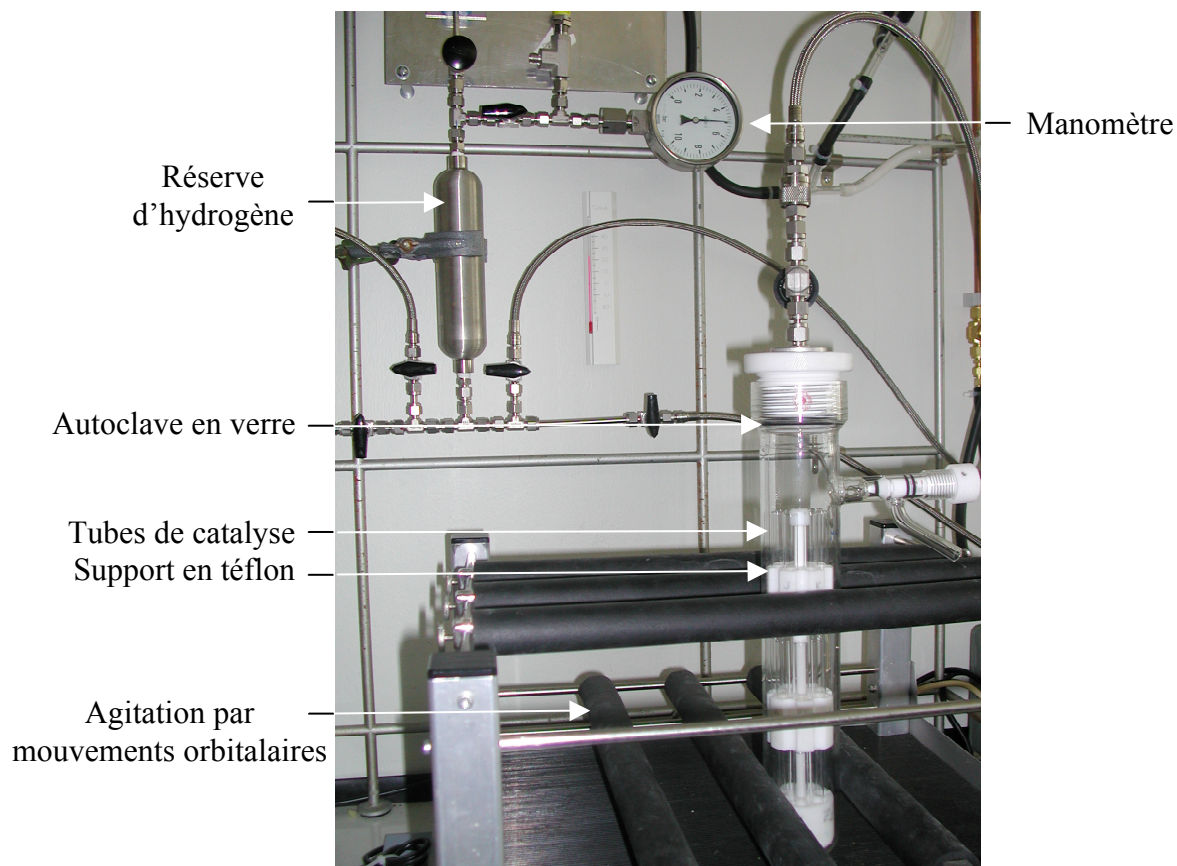


Figure 58. Autoclave en verre.

II.3.1.2.3. Les extractions

La catalyse est réalisée majoritairement en milieu aqueux. Afin d'utiliser un solvant organique adéquat pour l'extraction des différentes espèces présentes en solution, des essais de solubilité ont été réalisés sur l'acide β -acétamidoacrylique et la *N*-acétamidoalanine. Deux solvants organiques non miscibles avec l'eau ont été testés: l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane. Les tests de solubilité montrent que l'acétate d'éthyle est un solvant de choix pour l'extraction. L'acide β -acétamidoacrylique et la *N*-acétamidoalanine sont des composés très peu solubles dans le dichlorométhane. Les tests réalisés dans l'eau montrent une très bonne solubilisation du substrat et du produit.

Afin de s'affranchir de la présence de la protéine lors de l'étape d'extraction, la solution de catalyse est placée, après son acidification à pH 2, dans une cellule de centrifugation *Millipore* d'une contenance maximale de 2 mL et possédant une membrane en cellulose sélective aux composés ayant un poids moléculaire supérieur à 5000 g mol^{-1} . La solution est ensuite centrifugée à 5000 G pendant 4h. La protéine de poids moléculaire supérieur à 5000 g/mol reste sur la membrane. Une extraction manuelle avec une ampoule à décanter d'une contenance de 10 mL est ensuite réalisée. Étant donné le nombre de catalyses lancées simultanément, cette méthode s'est vite montrée fastidieuse. Un système a donc été mis au point afin d'optimiser cette opération: l'extraction en continu. Ce dispositif repose sur l'installation en série de 30 extracteurs en continu (Figure 59). Le réfrigérant à eau étant remplacé par un réfrigérant à air d'une hauteur de 90 cm. Après différentes simulations, l'extraction des produits est optimale après deux heures de reflux. La protéine reste en phase aqueuse et se colle au fritté. Ce dernier doit être, après chaque utilisation, lavé avec une solution d'acide chlorhydrique concentré.

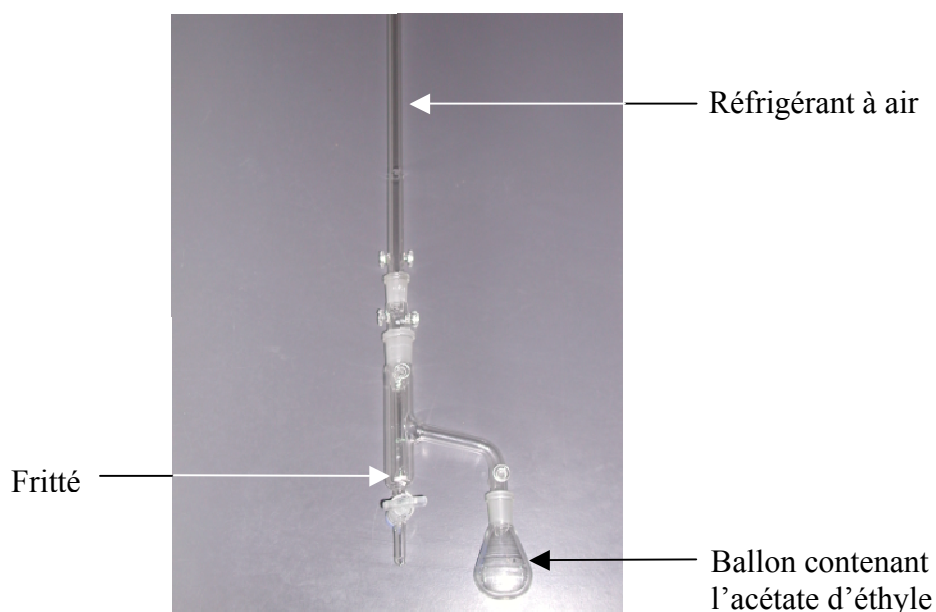


Figure 59. Dispositif d'extraction en continu.

II.3.1.2.4. L'analyse des échantillons

L'analyse de l'échantillon de la catalyse est réalisée sur un GC Agilent série 9200 équipé d'un auto échantillonneur de 100 vials. L'échantillon, après avoir été préalablement dérivatisé *in situ* par l'hydroxyde de triméthylsulfonium $S(CH_3)_3OH$, est injecté sur une colonne chirale Heptakis-2,3,6-péréthyle- β -cyclodextrine. Deux exemples de chromatogrammes sont représentés dans la Figure 60.

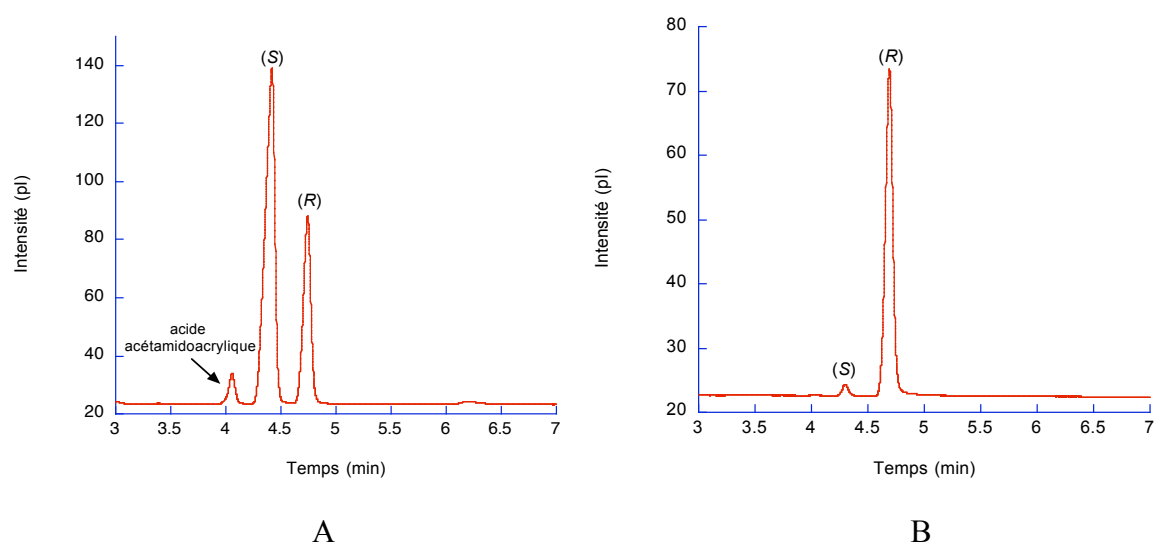


Figure 60. Exemple de séparation des énantiomères (R) et (S) de l'acétamidoalanine en GC sur colonne chirale. A) Séparation des énantiomères de l'acétamidoalanine obtenus après catalyse dans l'avidine. Le produit de départ non réagi est clairement visible, permettant ainsi d'estimer par intégration le taux de conversion, B) Séparation des énantiomères de l'acétamidoalanine obtenus après catalyse dans la streptavidine.

II.3.2. Hydrogénation asymétrique de l'acide β -acétamidoacrylique catalysée par le complexe $[\text{Rh}(\text{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ dans l'avidine

II.3.2.1. Les résultats de la catalyse

La première expérience d'hydrogénation catalytique utilisant l'avidine comme inducteur chiral a été réalisée au laboratoire en s'inspirant des travaux de G. Whitesides en 1978⁸⁸. L'avidine "wild type" est une protéine commerciale. Cependant son coût est prohibitif: 1g vaut 10 000 CHF. Durant ce travail de thèse, cette protéine nous a été offerte par la société Belovo Egg Science and Technology (Belgique). Cette société produit une large gamme de protéines purifiées (lysosyme, avidine, ovotransferrine) et de phospholipides mis à disposition d'entreprises des secteurs alimentaires, pharmaceutiques et cosmétique. L'avidine est extraite du blanc d'œuf de poule.

La préparation du complexe précurseur achiral $[\text{Rh}(\text{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ est effectuée *in situ* par complexation du ligand biotinylé aminodiphosphine **Biot-1** sur le complexe $[\text{Rh}(\text{COD})_2]\text{BF}_4$ (Figure 61).

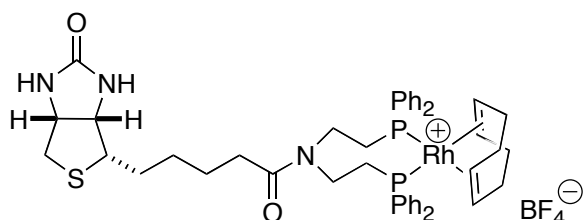


Figure 61. Complexe précurseur $[\text{Rh}(\text{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$.

Afin d'être sûr que la totalité du complexe biotinylé $[\text{Rh}(\text{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ se trouve dans la protéine, le rapport complexe/protéine (avec le poids moléculaire corrigé pour 4 sites actifs)

est fixé à 3 plutôt qu'à 4 et ce pour toutes les protéines qui ont été testées lors de cette étude. De ce fait 0.33 mol% de protéine tétramérique et 1% mole de complexe biotinylé sont utilisés pour l'hydrogénation asymétrique de l'acide α -acétamidoacrylique (Figure 62).

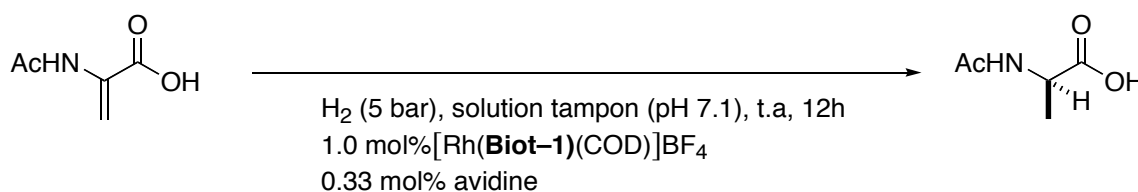


Figure 62. Hydrogénation énantiosélective de l'acide α -acétamidoacrylique en utilisant le complexe [Rh(**Biot-1**)(COD)]BF₄ dans l'avidine.

Des modifications ont été cependant apportées aux conditions expérimentales initiales de l'hydrogénation asymétrique de l'acide α -acétamidoacrylique réalisée par G. Whitesides. Ainsi, l'expérience de catalyse est effectuée sous une pression 5 bars d'hydrogène (au lieu de 1bar), à température ambiante (au lieu de 0°C) et pendant 12h (au lieu de 48h).

Après différents traitements (acidification à pH 2, extraction en continu à l'acétate d'éthyle), l'échantillon de catalyse est estérifié à l'aide de l'hydroxyde de triméthylsulfonium et est analysé en chromatographie en phase gazeuse sur une colonne chirale. L'excès énantiomérique ainsi déterminé est de 39% en faveur de l'énantiomère (*S*) de la *N*-acétamidoalanine et la conversion est de 96%.

Influence du pH sur la catalyse:

La catalyse décrite précédemment est réalisée dans un tampon phosphate d'une concentration finale de 0.07 M avec un pH de 7.1. Afin de comprendre si la valeur du pH a une influence sur la catalyse et donc sur l'énantiosélectivité, la même expérience de catalyse dans l'avidine est effectuée dans un milieu non tamponné en utilisant simplement de l'eau "milliQ". La valeur du pH de la solution de catalyse est de 3.4.

Le résultat de cette nouvelle expérience est assez inattendu. La conversion est totale au bout de 12 h, mais l'excès énantiomérique est nul. Ce résultat peut s'expliquer par la valeur du point isoélectrique de l'avidine qui est de 10.4. Au pH de la catalyse, la protéine a une charge globale positive. Étant donné que le complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ est cationique, les interactions de Coulomb sont très fortes, ce qui a pour effet une répulsion entre la protéine et le complexe empêchant ce dernier de pénétrer dans l'avidine. Ce dernier ne bénéficiant pas de l'environnement chiral de la protéine génère quantitativement le racémate. Nous tenterons de voir par la suite (chapitre II.3.3.1.) si cette hypothèse est justifiée.

L'utilisation d'un tampon de phosphate à une concentration de 0.07 M semble jouer un rôle déterminant. En effet, pour obtenir un excès énantiomérique de 39% (*S*), il est nécessaire d'ajouter un équivalent de Na_2HPO_4 par rapport au substrat. La déprotonation de l'acide \square -acétamidoacrylique semble être très importante: aucune sélectivité n'est observée si la même catalyse est réalisée dans un milieu tamponné à pH 7 par le MOPS (l'acide 3-(*N*-Morpholino)propanesulfonique) d'une concentration finale de 0.1 M. Dans ce cas, le racémate est formé presque quantitativement (93%). La force ionique de la solution de la catalyse, la nature de la solution tampon semblent influencer fortement la sélectivité lors de la

réaction. Des études au laboratoire sont en cours pour comprendre l'effet du tampon sur la catalyse (effet de la force ionique, de la concentration du tampon, du pH).

II.3.3. Hydrogénation asymétrique de l'acide β -acétamidoacrylique catalysée par le complexe $[\text{Rh}(\text{Biot}-1)(\text{COD})]\text{BF}_4$ dans la streptavidine

II.3.3.1. Les résultats de la catalyse

L'avidine et la streptavidine ont des affinités très fortes pour la biotine: $K_a \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$ pour le complexe biotine-avidine et $K_a \sim 10^{13} \text{ M}^{-1}$ pour le complexe biotine-streptavidine^{58,78}.

Cependant ces deux protéines sont différentes sous divers aspects:

a) L'avidine est une glycoprotéine avec un point isoélectrique de 10.4. Celui de la streptavidine (protéine non-déglycosylée) est de 6.4.

b) Une des différences structurales entre les deux protéines réside dans un brin d'acides aminés: la boucle L 5,6 (reliant les feuillets $\beta 5$ et $\beta 6$) qui ferme la poche hydrophobe où vient s'ancrer la biotine. Cette boucle 5,6 est beaucoup plus grande dans le cas de la streptavidine, ce qui lui confère une poche chirale plus profonde que celle de l'avidine^{108,109} (Figure 63).

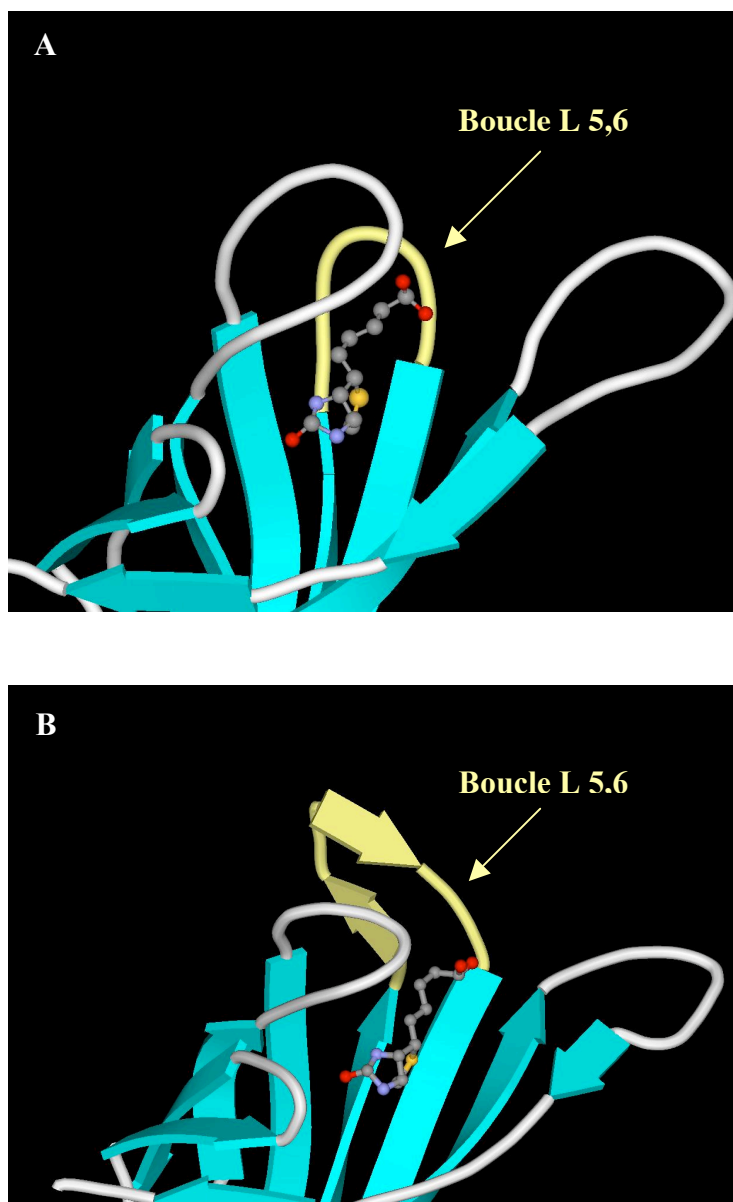


Figure 63. A) site actif de l'avidine, B) site actif de la streptavidine. La boucle 5,6 (en jaune) est indiquée par une flèche. La biotine est représentée au centre de la cavité du site actif.

Du fait de ses différences structurales avec l'avidine, la streptavidine a été testée comme hôte chiral pour l'hydrogénation asymétrique de l'acide α -acétamidoacrylique. La streptavidine est produite au sein du laboratoire de biochimie par le doctorant N. Humbert. La protéine est exprimée dans le cytoplasme de la bactérie *Escherichia Coli*^{76,110}. Le plasmide de la protéine a été fourni par C. R. Cantor. Après optimisation des conditions opératoires, la production de la

protéine est d'environ 140 mg/litre de culture. Un exemple de courbe de titration de la protéine par la biotine-4-fluorescéine est représentée ci-dessous (Figure 64). Pour ce lot de protéine, le nombre de sites actifs déterminé est de 3.9.

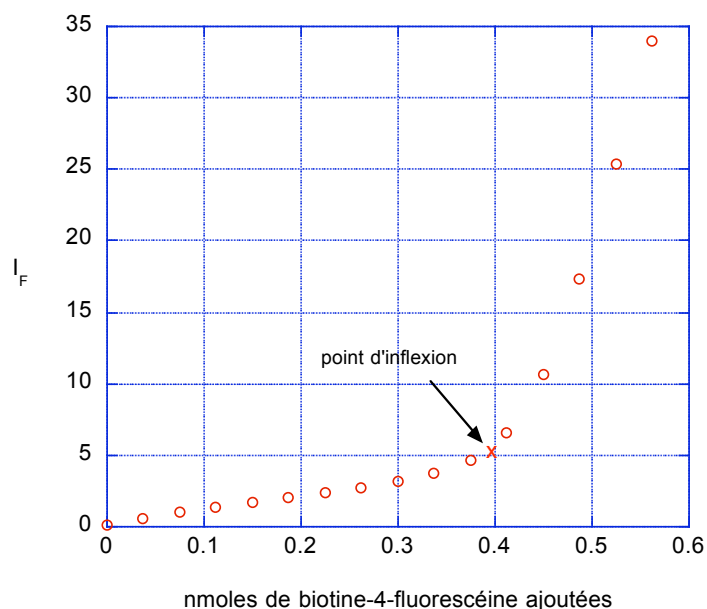


Figure 64. Courbe de titrage fluorimétrique de la streptavidine.

Cette nouvelle protéine a été testée en catalyse à différents pH: 3.4 (eau), 4 (tampon acétate, 0.1 M) et 7 (tampon MOPS, 0.1 M) (Figure 65). Les quantités de complexe et de protéine utilisées dans ces expériences sont identiques à celles réalisées précédemment.

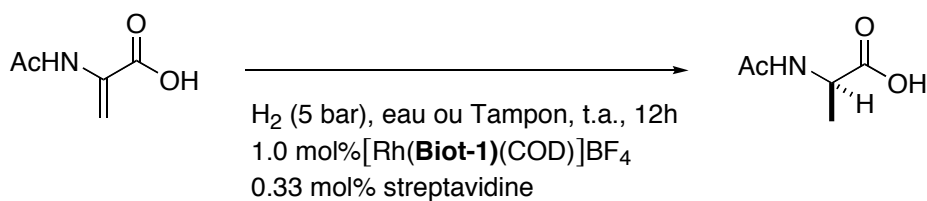


Figure 65. Hydrogénation énantiosélective de l'acide β -acétamidoacrylique en utilisant le complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ dans la streptavidine.

Les résultats de la catalyse sont spectaculaires: outre une conversion totale du substrat au bout de 12 heures, on observe une inversion de la sélectivité par rapport à la catalyse effectuée dans l'avidine: l'énantiomère (*R*) est obtenu préférentiellement avec un excès énantiomérique de 94% (entrées 1 et 2, tableau 12). Le pH semble avoir peu d'influence sur la sélectivité, puisqu'à pH neutre, l'excès énantiomérique baisse seulement de 2% (92% ee (*R*), entrée 3).

Entrées	pH	Conversion (%)	ee (%) (<i>R</i>)
1	3.2	100	94
2	4	100	94
3	7	94	92

Tableau 12. Résultats des catalyses effectuées à différents pH dans la streptavidine.

Nous pouvons spéculer que la streptavidine est meilleur inducteur chiral que l'avidine du fait de la différence de point isoélectrique entre les deux protéines. À pH neutre (MOPS, pH 7), l'affinité du complexe cationique $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]^+$ serait plus forte pour la streptavidine, ce qui se traduirait par une meilleure sélectivité. Afin de montrer si c'est l'explication est valable, les constantes d'affinité du complexe cationique $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]^+$ pour l'avidine ($K_{[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]^+ \square \text{avidine}}$) et la streptavidine ($K_{[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]^+ \square \text{streptavidine}}$) ont été déterminées par J. Sauser et le doctorant A. Loosli :

$$\text{Log} (K_{[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]^+ \square \text{avidine}}) = 7.6$$

$$\text{Log} (K_{[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]^+ \square \text{streptavidine}}) = 7.1$$

Ces deux constantes de stabilité sont très proches, ce qui montre que l'affinité du complexe biotinylé $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]^+$ pour les deux protéines est indépendant du point isoélectrique pour une valeur de pH donné. A pH 7 (MOPS, 0.1M), les différences observées dans les excès

énantiomériques entre les deux protéines (racémat pour l'avidine, 94% (*R*) pour la streptavidine) ne sont pas dues à une différence d'affinité du complexe pour les deux protéines mais plus probablement à une différence de topographie de la poche chirale du site actif.

La structure de la streptavidine (poche chirale plus profonde et boucle L 5.6 plus grande par rapport à l'avidine) a une grande influence et un effet bénéfique sur la sélectivité de la réaction: La boucle L 5,6 beaucoup plus grande dans la streptavidine apporte un environnement chiral favorable proche du complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]^+$ et induit une meilleure sélectivité (94% ee (*R*)).

A la vue de ces premières expériences de catalyse, la sélectivité optimale est obtenue à pH acide dans la streptavidine et à pH neutre dans l'avidine.

II.3.3.2. Influence du pourcentage de complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ sur la catalyse

Les expériences de catalyses précédentes réalisées dans les deux protéines ont été effectuées avec 1% mole de complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ par rapport au substrat. L'objectif de ces prochaines expériences est de diminuer la quantité de protéine par rapport à la catalyse classique. Nos efforts se sont donc portés sur des expériences de catalyses réalisées dans la streptavidine en utilisant des quantités décroissantes de complexes : 5‰, 4‰ et 1‰ .

Les expériences avec 5‰ et 4‰ mole de complexe ont été réalisées par simple dilution de la solution stock de complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ utilisée pour les expériences nécessitant 1% mole de complexe. Cependant, aucune dilution n'a été effectuée pour l'expérience

nécessitant 1‰ mole de complexe: la quantité de $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ étant tellement faible, la seule trace d'air (quelques ppm) aurait suffi à dégrader le complexe prématurément. A cet effet, seule la quantité de substrat a été modifiée, 10 fois plus concentrée (0.056 M), par rapport à la concentration de substrat (5.6 mM) utilisée pour une catalyse normale nécessitant 1‰ mole de complexe.

L'utilisation d'une quantité plus faible de complexe (et donc de protéine) ne semble pas affecter le résultat standard de la catalyse (1‰ mole de complexe: 100% conv., 94% ee (*R*)). L'énantiomère (*R*) est obtenu quantitativement avec un excès énantiomérique de 93% lorsque la réaction est catalysée avec 5‰ mole de complexe (entrée 1, tableau 13). Ce résultat varie peu dans le cas de l'utilisation de 4‰ mole de complexe (conv. 98%, ee 91% (*R*), entrée 2). Cependant une grande variation de l'excès énantiomérique et de la conversion est observée dans le cas de l'utilisation de 1‰ mole de complexe: l'excès énantiomérique chute à 67% (*R*) pour une conversion de 60% (entrée 3). Cette observation peut s'expliquer par le fait que le substrat se solubilise très mal dans la solution à 56 mM.

Entrées	‰ mole complexe	Conversion (%)	ee (%) (<i>R</i>)
1	5	100	93
2	4	98	91
3	1	60	67

Tableau 13. Résultats de catalyses effectuées avec des quantités décroissantes de complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ dans la streptavidine.

Toutes les études réalisées sur la réaction d'hydrogénation asymétrique de l'acide \square -acétamidoacrylique en milieu protéinique sont effectuées avec 1‰ mole de complexe

[Rh(**ligand**)(COD)]BF₄. En utilisant des quantités plus faibles, le complexe pourrait facilement s'oxyder avec quelques ppm d'oxygène.

II.3.3.3. Catalyse réalisée en milieu deutéré

Afin d'avoir la certitude que la réduction de l'acide α -acétamidoacrylique s'effectue par la source d'hydrogène provenant du gaz H₂ et non des protons présents dans la solution tampon, une réaction de catalyse a été réalisée par substitution de l'eau par D₂O. Le solvant aprotique DMSO n'étant pas remplacé par son analogue deutéré. Le résultat de cette catalyse a été comparé à celui obtenu pour la catalyse réalisée dans la streptavidine en milieu non tamponé (dans l'eau: conv. 100%, 94% ee (*R*)). La solution de catalyse a été ensuite analysée, après extraction en continue, en RMN ¹H et par injection au GC sur colonne chirale après dérivatisation par l'hydroxyde de triméthylsulfonium.

Le spin de l'atome d'hydrogène est $S = 1/2$ et celui de l'atome de deutérium $S = 1$. La multiplicité d'un signal résultant d'un couplage J_{HD} est un pseudo triplet. Dans le cas où l'on obtiendrait l'acétamidoalanine deutérée résultant de la réduction du substrat par le deutérium (Figure 66), alors les multiplicités de chaque atome d'hydrogène H^{1a} et H^{1b} non équivalents devraient être: tdt (t = pseudo triplet, d = doublet). Les atomes d'hydrogène équivalents H² auraient un singulet comme multiplicité.

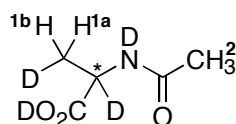


Figure 66. Acétamidoalanine: Produit résultant de la réduction du substrat par le deutérium.

Or ce n'est pas le cas, l'étude du spectre en RMN ^1H (200 MHz, D_2O , 20°C) montre les déplacements chimiques suivants: 1.30 ppm (d, $J = 3.75$ Hz ; 3H; H^2), 1.95 ppm (s, 3H; H^3), 4.23 ppm (q, $J = 3.75$ Hz ; 1H ; H^1) (Figure 67). On peut donc conclure à la présence de la *N*-acétamidoalanine non deutérée. Les autres signaux observés correspondent aux protons caractérisant la présence du substrat de départ: l'acide β -acétamidoacrylique (2.12 ppm (s, 3H; CH_3), 5.95 ppm (d, $J = 2.08$ Hz, 2H; protons éthyléniques) (Figure 67). La conversion de la réaction déterminée par l'analyse du spectre RMN ^1H est de 90%.

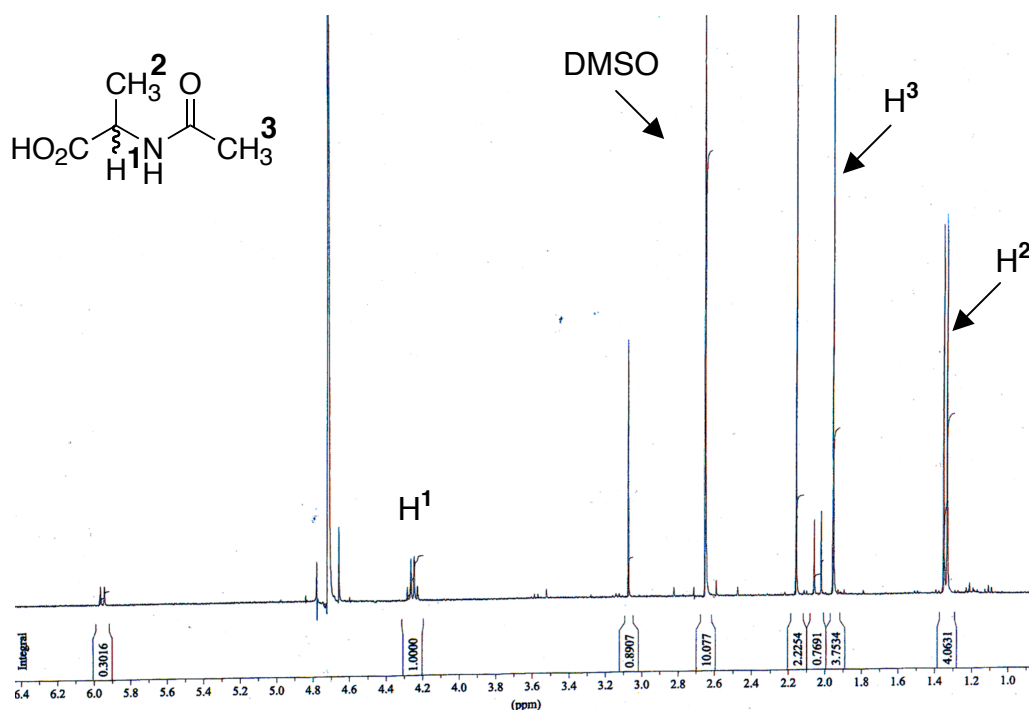


Figure 67. Spectre RMN ^1H de l'échantillon de catalyse effectuée dans D_2O .

L'analyse du spectre GC montre une conversion de 94% et un excès énantiomérique de 90% en faveur de l'énantiomère (*R*). Cette méthode analytique pour déterminer le taux de conversion (conv. 94%) est vraisemblablement plus précise que l'étude du spectre RMN ^1H (conv. 90%).

Quel phénomène est à l'origine de la différence de 4% d'excès énantiomérique entre la catalyse standard dans l'eau (ee 94% (*R*)) et celle réalisée dans l'eau deutérée (ee 90% (*R*)) ? Les travaux réalisés par Williams¹¹¹ ont porté sur l'étude de l'incorporation du deutérium dans la streptavidine et dans le complexe streptavidine–biotine. Les résultats expérimentaux ont démontré que 72–74 résidus –NH sont substitués par le deutérium dans chaque monomère de streptavidine. Dans le cas du complexe streptavidine-biotine, seulement 48–58 résidus sont substitués (Figure 68).

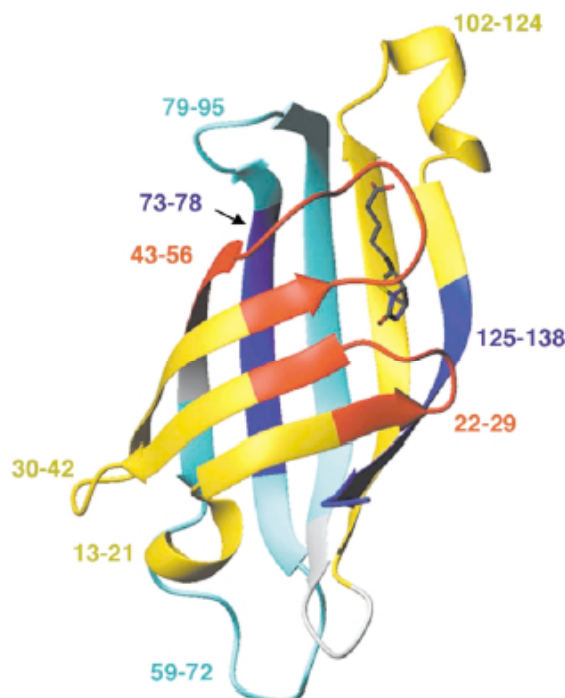


Figure 68. Représentation d'une sous-unité de la streptavidine avec la biotine dans la cavité. La proportion de substitution des résidus –NH par le deutérium est représenté par une couleur : > 30% (rouge), 20–30% (jaune), 10–20% (bleu clair) et < 10% (bleu foncé).

Ce phénomène s'explique par une diminution de la flexibilité du monomère lorsque la biotine est fixée au site actif, ce qui empêche la substitution des résidus –NH par le deutérium¹¹². Dans le cas de notre expérience de catalyse, la streptavidine ne possède pas initialement ses

sites actifs saturés par le complexe biotinylé. Nous nous trouvons donc dans le premier cas de l'expérience de Williams où la streptavidine possède des résidus NH substitués par le deutérium (72 à 74 résidus par monomère). Etant donné que la distance du pont $\text{-ND}\cdots\text{O}=\text{C}$ est faiblement plus grande que la distance du pont $\text{-NH}\cdots\text{O}=\text{C}$, alors on peut supposer que la conformation de la streptavidine est faiblement perturbée. Est-ce que ce changement conformationnel peut affecter l'affinité du complexe biotinylé pour la streptavidine deutérée? Cela semble peu probable. En effet, la constante d'affinité du complexe pour la streptavidine (non deutérée) est $K_a = 10^{7.1} \text{ M}^{-1}$. L'énergie libre standard du système à température ambiante est de $\Delta G^\circ = -RT \ln K_a = -9.7 \text{ kcal/mol}$ (où $R = 1.99 \text{ cal/mol}\cdot\text{K}$, $T = 298\text{K}$). Si on considère le cas extrême où l'on perd 1 kcal/mol dans l'affinité du complexe biotinylé pour la streptavidine deutérée ($\Delta G^\circ = -8.7 \text{ kcal/mol}$), alors la nouvelle constante d'affinité serait de: $K_a' = e^{-\Delta G^\circ/RT} = 10^{6.4} \text{ M}^{-1}$. Cette constante reste tout de même élevée. Selon le postulat de Curtin-Hammett, lors d'une réaction chimique irréversible conduisant à la formation de deux énantiomères (*R*) et (*S*), l'obtention du produit majoritaire est contrôlée seulement par la différence des énergies libres standard $\Delta\Delta G^\ddagger$ des états de transitions. Ainsi selon l'expression $\ln [R]/[S] = \Delta\Delta G^\ddagger / RT$, il est possible de calculer cette valeur de $\Delta\Delta G^\ddagger$ pour chaque excès énantiomérique. Pour un excès énantiomérique de 94% (*R*), $\Delta\Delta G^\ddagger = 2 \text{ kcal/mol}$ et pour un excès énantiomérique de 90%, $\Delta\Delta G^\ddagger = 1.7 \text{ kcal/mol}$. La différence entre ces deux valeurs est seulement de 0.3 kcal/mol . Ceci est la conséquence, non pas d'une diminution de l'affinité de complexe biotinylé pour la protéine, mais plutôt de la légère modification structurale de la protéine engendrée par la substitution de résidus NH par le deutérium.

Cette expérience de catalyse réalisée en milieu deutéré a permis de mettre en évidence la nature de la source d'hydrogène intervenant dans la réduction de l'acide α -acétamidoacrylique en milieu aqueux: le gaz H_2 .

II.3.3.4. Effet de la pression d'hydrogène sur la catalyse

L'influence de la pression en hydrogène sur l'énantiosélectivité a fait l'objet de nombreuses études en catalyse asymétrique¹¹³⁻¹¹⁶. Il est ainsi démontré que dans certains cas, l'excès énantiomérique diminue avec une augmentation de la pression (et augmente avec une élévation de la température). Afin de déterminer si ce phénomène est également observé en milieu protéinique, une expérience de catalyse dans la streptavidine (pH 4) a été réalisée à différentes pressions d'hydrogène (1, 5, 10, 20, 50 et 95 bars). Ces expériences ont été réalisées chez Lonza (Viège) avec l'aimable collaboration du Dr. Dario Veghini. Le protocole opératoire a été adapté en fonction du dispositif mis à notre disposition: toutes les quantités ont été quintuplées. Le graphique (Figure 69) montre les résultats obtenus (avec une conversion totale après 5 h).

Aucune variation de l'excès énantiomérique n'est observée entre 1 bar et 5 bars de pression en hydrogène (94% ee (*R*)). L'application d'une pression de 10 bars suffit à faire chuter l'excès énantiomérique de 14% (80% ee (*R*)). Cette diminution est progressive: 76% ee (*R*) à 20 bars, 71% ee (*R*) à 50 bars, 68% ee (*R*) à 95 bars.

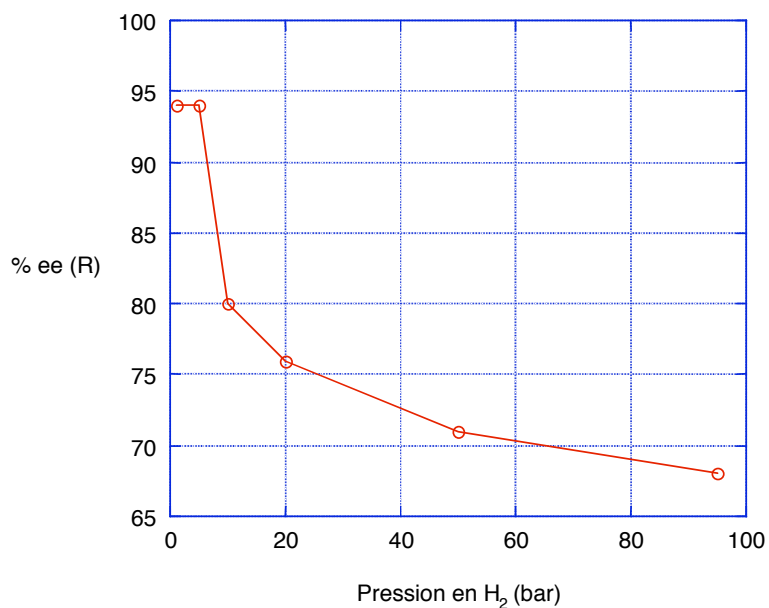


Figure 69. Influence de la pression d'hydrogène sur l'énantiosélectivité de l'hydrogénation asymétrique de l'acide \square -acétamidoacrylique par le complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ dans la streptavidine.

Cette baisse d'énantiosélectivité démontre que le phénomène étudié en catalyse homogène peut être appliqué aux hydrogénations catalytiques effectuées avec une métalloenzyme artificielle. Cependant, par rapport à une catalyse homogène classique, cette diminution est plus prononcée avec la métalloenzyme artificielle. Cela semble indiquer que la pression en hydrogène influe sur la conformation de la protéine.

L'effet de la température sur l'énantiosélectivité est actuellement à l'étude au laboratoire.

II.3.3.5. Le comportement des sites actifs

Le but des prochaines expériences est de voir l'effet de l'incorporation de la biotine sur les sites actifs et donc sur l'énantiosélectivité de la réaction. Cette étude repose sur la saturation préalable des sites actifs de la streptavidine par la biotine. Cette saturation s'effectue de façon progressive par l'ajout de 1 à 9 équivalents de biotine par rapport à un équivalent de streptavidine (dont le poids moléculaire aura été corrigé pour 4 sites actifs). La catalyse s'effectue à pH 4 (tampon acétate, 0.1 M) en utilisant 1% mole de complexe [Rh(**Biot-1**)(COD)]BF₄ par rapport au substrat, soit 3 équivalents par rapport à la protéine. Les résultats de ces catalyses sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 14).

Entrées	Eq. biotine / protéine	Conversion (%)	ee (%) (<i>R</i>)
1	0	100	94
2	1	100	90
3	2	100	52
4	3	99	0
5	4	99	0
6	5	99	0
7	6	99	0
8	7	99	0
9	8	97	0
10	9	98	0

Tableau 14. Expériences de catalyse réalisées avec 3 équivalents de complexe par rapport à la streptavidine avec saturation progressive des sites actifs par la biotine.

La première expérience, réalisée sans ajout de biotine, a servi de référence lors de cette étude (entrée 1, tableau 14). L'excès énantiomérique est de 94% (*R*) (3 équivalents de complexe par rapport à la protéine). Dès l'ajout préalable d'un équivalent de biotine, l'excès énantiomérique diminue de 4% (90% ee (*R*), entrée 2)). Lors de la quantification de la protéine par fluorimétrie et de la détermination du point d'inflexion de la courbe, l'erreur estimée est de 3

à 5%. Ce qui a des répercussions sur le nombre exact de sites actifs de la protéine et sur le calcul de son poids moléculaire corrigé pour 4 sites actifs. Dans le cas où le nombre de sites actifs de la streptavidine est surestimé, du complexe en excès $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ se trouve à l'extérieur de la protéine. L'excès de complexe catalyse la formation du racémat, ce qui a pour effet une diminution de l'excès énantiomérique.

Cependant, dès l'ajout de 2 équivalents de biotine, l'excès énantiomérique chute dramatiquement à 52% (*R*) (entrée 3). Seulement un équivalent de complexe se trouve normalement à l'extérieur de la protéine. Ce résultat, assez inattendu, peut s'expliquer par les études réalisées par T. Sanor et R. Cantor en 1990¹¹⁷: la fixation de la biotine dans le site actif de la streptavidine s'effectue de façon coopérative. Cela signifie que la fixation de la biotine dans un site induit le changement conformationnel du monomère voisin. Cette modification structurale du monomère et donc du site actif perturbe et diminue l'affinité du complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ pour la protéine, ce qui se traduit par une baisse de l'énantiosélectivité. Ce changement conformationnel peut également modifier la topographie du site actif et apporter un nouvel environnement chiral autour du complexe.

Lorsqu'un excès de biotine (égal ou supérieur à 4 équivalents) est préalablement mélangé avec un équivalent de streptavidine, l'excès énantiomérique chute dramatiquement: la totalité de la protéine possède ses sites actifs saturés par la biotine. Le complexe, ne pouvant pénétrer dans la protéine et bénéficier de son environnement chiral, catalyse la formation du racémat (ee 0%, entrées 5 à 10). Les résultats de ces catalyses ont conforté les travaux de T. Sanor et R. Cantor en montrant que la fixation de la biotine aux sites actifs de la streptavidine influe sur la conformation des sites voisins et donc sur l'énantiosélectivité de la catalyse.

II.3.3.6. Etude de l'accélération de la catalyse dans l'avidine et la streptavidine avec le complexe $[\text{Rh}(\text{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$

Afin de tester le concept de l'accélération de la catalyse dans la protéine, des expériences ont été réalisées à la fois dans la streptavidine et l'avidine en faisant varier les quantités de complexe $[\text{Rh}(\text{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$. Les expériences ont donc consisté à augmenter progressivement la quantité de complexe par rapport à la protéine, ce rapport allant de 1:1 à 10:1. Les expériences de catalyse dans la streptavidine ont été réalisées à pH 4 et à pH 7.1 dans l'avidine. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 15.

Dans le cas de la streptavidine, l'excès énantiomérique augmente progressivement avec l'ajout de 1 à 3 équivalents de complexes par rapport à la protéine (entrées 1 à 3, tableau 15). Cela suggère qu'il existe une coopérativité entre le complexe biotinylé et les sites actifs de la protéine. Les études en cours au laboratoire par les doctorants A. Loosli et E. Rusbandi montrent que l'insertion d'un équivalent de complexe biotinylé influe sur le site actif opposé et augmente l'affinité du second équivalent pour la protéine: on parle alors de coopérativité positive. Dans le cas de nos expériences, ce phénomène se traduit par l'augmentation progressive de l'excès énantiomérique (de 91 à 94% ee (*R*)). Ce phénomène semble également avoir lieu dans l'avidine (entrées 11 à 13).

Dans le cas de la streptavidine, la décroissance de l'excès énantiomérique est observée après l'ajout de 5 équivalents de complexe $[\text{Rh}(\text{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ (90% ee (*R*), entrée 5, tableau 15). Cette diminution s'accroît progressivement pour atteindre une valeur de 46% ee (*R*) à 10 équivalents (entrée 10). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'au delà de 4 équivalents de complexe ajoutés, la protéine possède la totalité de ses sites actifs saturés par le

complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$, l'excédant étant en dehors de la protéine, favorise ainsi la formation du racémat, faisant ainsi chuter l'excès énantiomérique. Cependant, lors des expériences réalisées précédemment avec la biotine, l'énantiomère (*R*) est obtenu avec un excès énantiomérique de 52% lorsqu'un peu plus d'un équivalent de complexe se trouve à l'extérieur de la protéine (entrée 3, tableau 14), alors que dans les expériences actuelles, 46% ee (*R*) sont obtenus pour 10 équivalents complexes biotinylé ajoutés (soit 6 équivalents à l'extérieur de la protéine) (entrée 10, tableau 15). Nous ne comprenons pas ce phénomène actuellement. Nous pouvons seulement suggérer que la biotine et le complexe biotinylé se comportent différemment dans la protéine.

Entrée	Protéine	Eq. Complexe vs protéine	Conversion (%)	ee (%)
1	Streptavidine	1	96	91 (<i>R</i>)
2	Streptavidine	2	98	93 (<i>R</i>)
3	Streptavidine	3	100	94 (<i>R</i>)
4	Streptavidine	4	100	94 (<i>R</i>)
5	Streptavidine	5	100	90 (<i>R</i>)
6	Streptavidine	6	100	85 (<i>R</i>)
7	Streptavidine	7	100	79 (<i>R</i>)
8	Streptavidine	8	100	74 (<i>R</i>)
9	Streptavidine	9	100	67 (<i>R</i>)
10	Streptavidine	10	99	46 (<i>R</i>)
11	Avidine	1	89	34 (<i>S</i>)
12	Avidine	2	96	36 (<i>S</i>)
13	Avidine	3	96	39 (<i>S</i>)
14	Avidine	4	96	38 (<i>S</i>)
15	Avidine	5	95	38 (<i>S</i>)
16	Avidine	6	91	38 (<i>S</i>)
17	Avidine	7	93	37 (<i>S</i>)
18	Avidine	8	88	36 (<i>S</i>)
19	Avidine	9	85	34 (<i>S</i>)
20	Avidine	10	83	32 (<i>S</i>)

Tableau 15. Expériences de catalyses réalisées dans la (strept)avidine par ajout croissant de complexe.

La diminution de l'excès énantiomérique est cependant beaucoup moins marquée dans le cas de l'avidine. Entre l'ajout de 3 à 6 équivalents de complexes (entrées 13-16), aucune réelle variation de l'excès énantiomérique n'est observée (38-39% ee (*S*)). Cette valeur diminue ensuite très lentement pour atteindre 32% ee (*S*) à 10 équivalents (entrée 20). À la vue de ces observations, l'hypothèse suivante peut être émise: Si la catalyse dans la protéine est plus rapide que celle effectuée à l'extérieure, alors cela a pour effet de contrecarrer la baisse de l'énantiosélectivité engendrée par la formation du racémat à l'extérieur de la protéine.

L'équation suivante (Equation 2) est proposée pour décrire le phénomène de l'accélération de la catalyse dans la protéine :

$$\% (\text{énantiomère majoritaire})_{\text{calculé}} = \frac{ak_a x + bk_b y}{ak_a + bk_b} \quad \text{équation 2}$$

où, k_a et k_b représentent respectivement les constantes de vitesse de la catalyse à l'intérieur et à l'extérieur de la protéine, a et b sont les équivalents de complexes $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ fixés à la protéine et libre en solution, et x et y sont respectivement le pourcentage d'énantiomère obtenu avec 4 équivalents de complexe fixés à la protéine et avec le complexe libre en solution ($y=0.5$).

Afin de déterminer la contribution de la protéine sur la vitesse de la catalyse, le pourcentage d'excès énantiomérique obtenu dans les deux protéines peut être calculé avec l'équation 2 dans le cas où les vitesses de catalyse sont identiques à l'extérieur et à l'intérieur de la protéine c'est à dire si $k_a = k_b$. Par exemple dans le cas de la streptavidine où 7 équivalents de complexe sont ajoutés, alors dans ce cas précis $a=4$ et $b=3$, $x=0.97$ (94% ee (*R*)) obtenus avec

4 eq. de complexe) et $y=0.5$ (racémate obtenu avec le complexe à l'extérieur de la protéine). Dans le cas où la vitesse de la catalyse serait identique à l'intérieur comme à l'extérieur de la protéine, le pourcentage de l'énantiomère (R) attendu serait alors de 77% soit un excès énantiomérique de 54% (R). Ce calcul a été effectué pour les deux protéines et les résultats sont représentés sur le graphique (Figure 70).

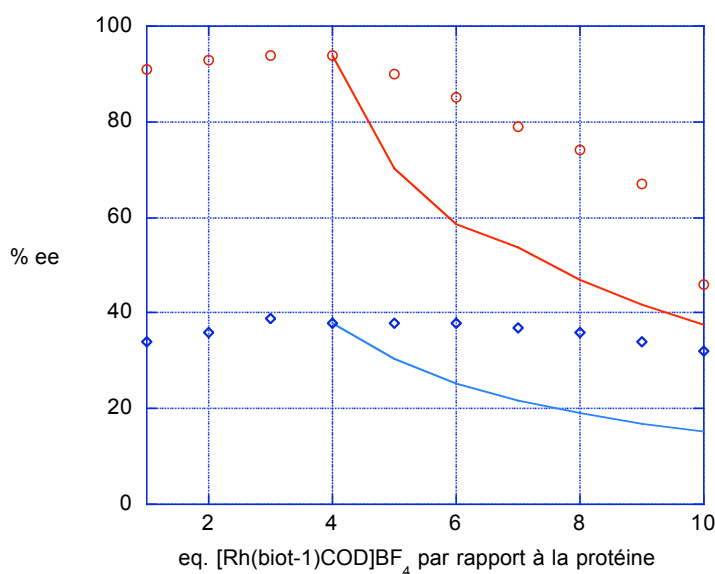


Figure 70. Courbes décrivant l'évolution de l'excès énantiomérique en fonction du rapport complexe/protéine allant de 1:1 à 10:1. Les cercles rouges correspondent aux ee (énantiomère R) obtenus *expérimentalement* dans la streptavidine, et les losanges bleus aux ee (énantiomère S) obtenus *expérimentalement* dans l'avidine. Les courbes continues représentent les ee *théoriques* obtenus dans le cas où $k_a = k_b$.

Le graphique montre une rapide diminution de l'excès énantiomérique si aucune accélération de la vitesse de la catalyse n'a lieu dans la protéine ($k_a = k_b$). A titre d'exemple, dans le cas de la streptavidine, lorsque l'excès énantiomérique est de 79% (R) à 7 équivalents de complexe ajouté, cette valeur chute à 54% ee (R) si on considère qu'il n'y a aucune accélération de la catalyse dans la protéine et que les vitesses à l'extérieur comme à l'intérieur sont strictement

identiques ($k_a = k_b$). Ce phénomène est également observé avec l'avidine. Pour le même nombre d'équivalent de complexe ajouté, l'excès énantiomérique chute de 15% si $k_a = k_b$ (22% ee (*S*) au lieu de 37% ee (*S*)). Cette diminution de l'excès énantiomérique s'accroît progressivement dans les deux protéines: l'écart entre les courbes expérimentales et théoriques ($k_a=k_b$) se prononce de plus en plus. Ces résultats démontrent une réelle accélération de la vitesse de la catalyse dans la protéine. Cette vitesse est d'autant plus grande dans l'avidine que dans la streptavidine. Dans le cas de 7 équivalents de complexe ajouté, le rapport k_a/k_b est de 28 dans l'avidine contre 4 dans la streptavidine. La très forte accélération de la vitesse de la catalyse dans l'avidine est à l'origine de la très faible diminution de l'excès énantiomérique observée dans les expériences précédentes (de 34% ee (*S*) à 32% ee (*S*)) lors de l'addition progressive du complexe (Tableau 15 et Figure 70). Pour 10 équivalents de complexe, le rapport k_a/k_b diminue pour chaque protéine. Il est de 12 pour l'avidine et de 2 pour la streptavidine, ce qui signifie que la vitesse de la catalyse à l'extérieur de la protéine augmente progressivement avec l'addition croissante de complexe biotinyllé. Actuellement aucune explication ne peut être avancée pour expliquer ce phénomène inattendu.

Ces expériences ont permis de mettre en évidence l'accélération de la catalyse dans nos métalloenzymes artificielles. Les expériences réalisées dans le chapitre II.3.3.5., semble indiquer que la biotine et le complexe biotinyllé se comportent différemment envers les sites actifs des protéines.

II.3.4. Modification chimique de la première sphère de coordination

II.3.4.1. Effet des ligands biotinylés **Biot-1**, **Biot-3ⁿ-1** et **Biot-4^q-1** sur l'énantiosélectivité de la réaction

La variation de la position du ligand dans la poche chirale de la protéine repose sur l'incorporation d'un espaceur achiral entre la biotine et le groupement aminodiphosphine **1**. Cette modification chimique du ligand s'effectue par l'incorporation d'acides aminés aliphatiques **3ⁿ** (n = 1–7) et aromatiques **4^q** (q = *ortho*, *méta*, *para*). Cela permet de sonder la topographie de la cavité de la protéine à la recherche d'un environnement chiral favorable pour la catalyse. Cependant, des catalyses ont été préalablement réalisées avec ces nouveaux ligands sans protéine afin de vérifier si aucune sélectivité n'est induite par les ligands biotinylés (le cycle tétrahydrothiofène de la biotine possède 3 centres de chiralité) (Tableau 16).

Entrées	Ligands biotinylés	Conversion (%)	ee (%)
1	Biot-1	81	0
2	Biot-3¹-1	100	0
3	Biot-3²-1	100	0
4	Biot-3³-1	100	0
5	Biot-3⁴-1	100	0
6	Biot-3⁵-1	96	0
7	Biot-3⁶-1	97	0
8	Biot-3⁷-1	99	3 (<i>R</i>)
9	Biot-4^{ortho}-1	84	4 (<i>R</i>)
10	Biot-4^{méta}-1	93	0
11	Biot-4^{para}-1	100	0

Tableau 16. Résultats de l'hydrogénation de l'acide \square -acétamidoacrylique sans protéine par les complexes de type $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^n\text{-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-4}^q\text{-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ (tampon acétate 0.1M, t.a., 5 bars, 12h).

Les résultats des catalyses montrent que les 3 centres de chiralité sur le cycle tétrahydrothifène de la biotine ont très peu d'influence sur la sélectivité de la catalyse (Tableau 16). Le racémate est formé préférentiellement ($ee < 4\%$ (R)).

Après ces expériences préliminaires, la sélectivité des nouveaux complexes préparés à partir de ligands **Biot-3ⁿ-1** et **Biot-4^q-1** a été testée sur l'hydrogénation asymétrique de l'acide α -acétamidoacrylique dans les deux protéines (avidine et streptavidine) (Figure 71).

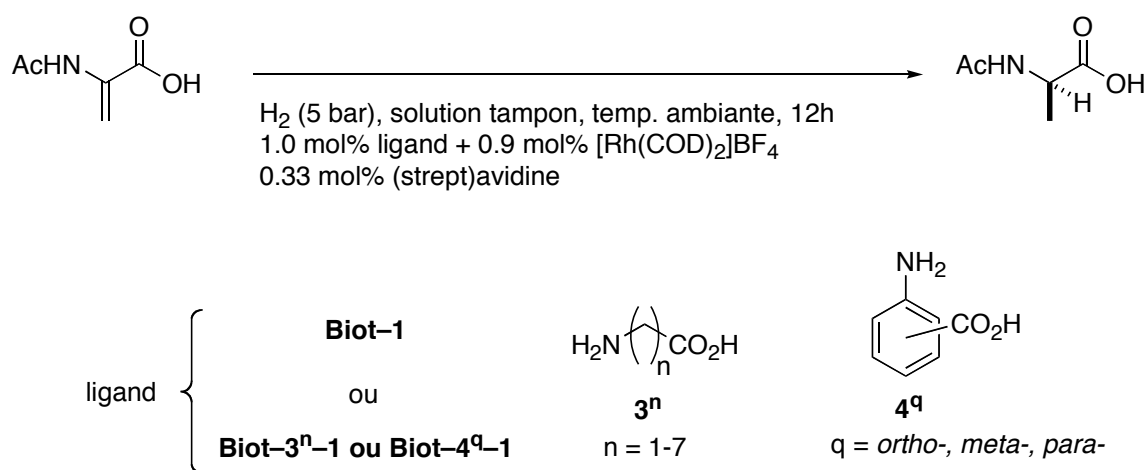


Figure 71. Hydrogénation énantiosélective de l'acide α -acétamidoacrylique dans la (strept)-avidine par des complexes de type $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^n\text{-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-4}^q\text{-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$.

Chaque expérience de catalyse a été testée à pH neutre et à pH acide. Seul figure dans le Tableau 17, le meilleur excès énantiomérique observé dans chaque cas. L'introduction de la glycine comme espaceur entre la biotine et le groupement aminodiphosphine **1** a un effet bénéfique sur la sélectivité du complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^1\text{-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ lorsque l'avidine est utilisée comme inducteur chiral (60% ee (S), entrée 2, tableau 17). L'insertion de cet acide aminé permet d'augmenter l'excès énantiomérique de près de 20% en faveur de l'énantiomère

(*S*) en comparaison de la catalyse réalisée avec le complexe sans espaceur [Rh(**Biot-1**)(COD)]BF₄ (39% ee (*S*), entrée 1). L'optimisation de la sélectivité est d'autant plus marquée lorsque la L-alanine est utilisée comme espaceur: la sélectivité du complexe [Rh(**Biot-3²-1**)(COD)]BF₄ est de 69% en faveur de l'énantiomère (*S*). Cependant cette valeur chute dramatiquement dès l'insertion d'un groupement méthylène supplémentaire via l'acide aminobutyrique. L'excès énantiomérique est de 3% (*S*) (entrée 4). L'incorporation d'espaceur aliphatiques **3ⁿ** où n>2 a peu d'effet sur la sélectivité des complexes [Rh(**Biot-3ⁿ-1**)(COD)]BF₄. L'excès énantiomérique est inférieur à 15% (*S*) (entrée 6).

Entrées	Ligands biotinylés	Protéines	Tampon	Conversion (%)	ee (%)
1	Biot-1	avidine	phosphate	96	39 (<i>S</i>)
2	Biot-3¹-1	avidine	MOPS	100	60 (<i>S</i>)
3	Biot-3²-1	avidine	MOPS	100	69 (<i>S</i>)
4	Biot-3³-1	avidine	MOPS	100	3 (<i>S</i>)
5	Biot-3⁴-1	avidine	MOPS	100	7 (<i>R</i>)
6	Biot-3⁵-1	avidine	MOPS	100	15 (<i>S</i>)
7	Biot-3⁶-1	avidine	MOPS	44	7 (<i>S</i>)
8	Biot-3⁷-1	avidine	MOPS	100	6 (<i>S</i>)
9	Biot-4^{ortho}-1	avidine	phosphate	92	6 (<i>S</i>)
10	Biot-4^{meta}-1	avidine	MOPS	100	16 (<i>S</i>)
11	Biot-4^{para}-1	avidine	MOPS	100	10 (<i>S</i>)
12	Biot-1	streptavidine	acetate	100	94 (<i>R</i>)
13	Biot-3¹-1	streptavidine	acetate	100	24 (<i>S</i>)
14	Biot-3²-1	streptavidine	acetate	100	5 (<i>S</i>)
15	Biot-3³-1	streptavidine	acetate	100	28 (<i>R</i>)
16	Biot-3⁴-1	streptavidine	acetate	100	0 -
17	Biot-3⁵-1	streptavidine	phosphate	82	36 (<i>S</i>)
18	Biot-3⁶-1	streptavidine	acetate	28	5 (<i>R</i>)
19	Biot-3⁷-1	streptavidine	acetate	99	0 -
20	Biot-4^{ortho}-1	streptavidine	acetate	100	23 (<i>R</i>)
21	Biot-4^{meta}-1	streptavidine	acetate	100	5 (<i>S</i>)
22	Biot-4^{para}-1	streptavidine	acetate	100	17 (<i>R</i>)

Tableau 17. Résultats de l'hydrogénation énantiosélective de l'acide L-acétamidoacrylique dans la (strept)avidine par des complexes de type [Rh(**Biot-1**)(COD)]BF₄, [Rh(**Biot-3ⁿ-1**)(COD)]BF₄, [Rh(**Biot-4^q-1**)(COD)]BF₄.

Dans le cas de la catalyse réalisée dans la streptavidine, l'introduction de la glycine comme espaceur a un effet surprenant sur la sélectivité du complexe $[\text{Rh}(\text{Biot-3}^1\text{-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$. L'excès énantiomérique est de 24% (*S*). Or dans le cas du complexe sans espaceur $[\text{Rh}(\text{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$, l'excès énantiomérique est de 94% (*R*). L'insertion de la glycine entre la biotine et le ligand aminodiphosphine **1** provoque une inversion de la sélectivité. La formation préférentielle de l'énantiomère (*S*) est également observée pour les espaceurs aliphatiques **3**² et **3**⁵. Les sélectivités des complexes $[\text{Rh}(\text{Biot-3}^2\text{-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ et $[\text{Rh}(\text{Biot-3}^5\text{-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ sont respectivement de 5% (*S*) et 36% (*S*) (entrées 14, 17).

Ces premières observations montrent que les deux énantiomères de l'acétamidoalanine peuvent être obtenus dans la streptavidine, alors que dans l'avidine, seule l'énantiomère (*S*) est obtenu préférentiellement.

Dans le cas de l'utilisation d'acides aminés aromatiques comme espaceurs, les excès énantiomériques obtenus sont relativement faibles dans les deux protéines ($ee < 25\%$). Dans le cas de la streptavidine, la sélectivité chute avec l'utilisation du complexe $[\text{Rh}(\text{Biot-4}^{\text{méta}}\text{-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ où le groupement aminodiphosphine se situe en position méta (5% ee (*S*), entrée 21). Alors que dans le cas de l'avidine, l'excès énantiomérique baisse lorsque le groupement aminodiphosphine se situe en position ortho (6% ee (*S*) entrée 9).

D'une façon générale :

a) La streptavidine est meilleur inducteur chiral que l'avidine (94% ee (*R*) dans la streptavidine et 69% ee (*S*) dans l'avidine).

b) L'avidine génère l'énantiomère (*S*).

c) Dans les deux protéines, l'introduction d'espaceur à longues chaînes aliphatiques **3ⁿ** (n = 6 et 7) ne permet pas d'optimiser l'énantiosélectivité. L'excès énantiomérique est proche de zéro.

II.3.4.2. Effet des ligands biotinylés **Biot-2**, **Biot-3ⁿ-2** et **Biot-4^q-2** sur l'énantiosélectivité de la réaction

La seconde modification de la première sphère de coordination a été de modifier la conformation du ligand et tester ainsi son influence sur l'énantiosélectivité de la réaction. Etant donné que le ligand précédemment testé **Biot-1** forme un chélate à 8 chaînons avec le métal, nos efforts se sont portés sur l'utilisation d'un nouveau ligand formant un chélate à 6 chaînons. Un nouveau ligand **Biot-2** a été préparé (Figure 72):

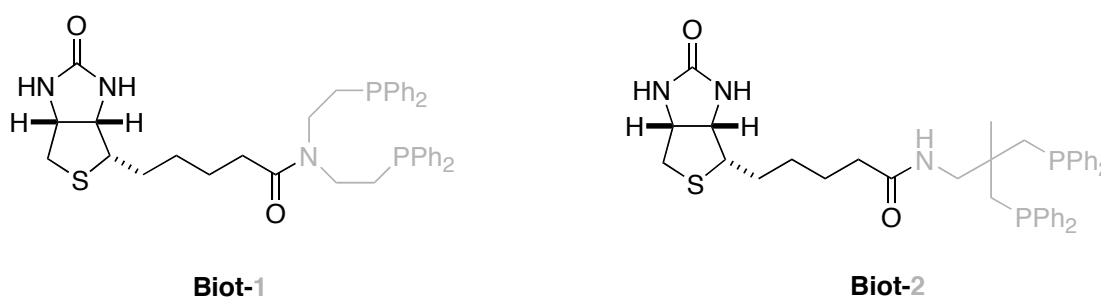


Figure 72. Représentation du ligand bidenté flexible **Biot-1** et du ligand bidenté rigide **Biot-2**.

Afin de tester l'effet de l'incorporation d'espaceurs dans ce nouveau ligand **Biot-2** sur l'énantiosélectivité, de nouveaux complexes ont été préparés ($[\text{Rh}(\mathbf{Biot-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^n\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$ et $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-4}^q\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$) par l'incorporation d'acides

aminés aliphatiques (**3ⁿ**, n = 1–7) et aromatiques (**4^q**, q = *ortho*, *méta*, *para*) entre la biotine et le ligand bidenté **2**. De la même façon que précédemment, ces complexes ont été testés préalablement sur l'hydrogénation asymétrique de l'acide \square -acétamidoacrylique sans protéine. Le racémat est formé préférentiellement lorsque la catalyse est réalisée sans protéine (ee < 3% (*S*), entrée 5, tableau 18).

Entrées	Ligands biotinylés	Conversion (%)	ee (%)
1	Biot-2	100	0
2	Biot-3¹-2	100	0
3	Biot-3²-2	100	0
4	Biot-3³-2	100	0
5	Biot-3⁴-2	98	3 (<i>S</i>)
6	Biot-3⁵-2	100	0
7	Biot-3⁶-2	90	0
8	Biot-3⁷-2	98	0
9	Biot-4^{ortho}-2	98	0
10	Biot-4^{méta}-2	100	0
11	Biot-4^{para}-2	88	0

Tableau 18. Résultats de l'hydrogénation de l'acide \square -acétamidoacrylique sans protéine par des complexes de type $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^n\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$ et $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-4}^q\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$ (tampon MOPS 0.1M, t.a., 5 bars, 12h).

Après ces expériences préliminaires, la sélectivité des nouveaux complexes préparés à partir de ligands **Biot-3ⁿ-2** et **Biot-4^q-2** a été testée sur l'hydrogénation asymétrique de l'acide \square -acétamidoacrylique dans les deux protéines (Figure 73).

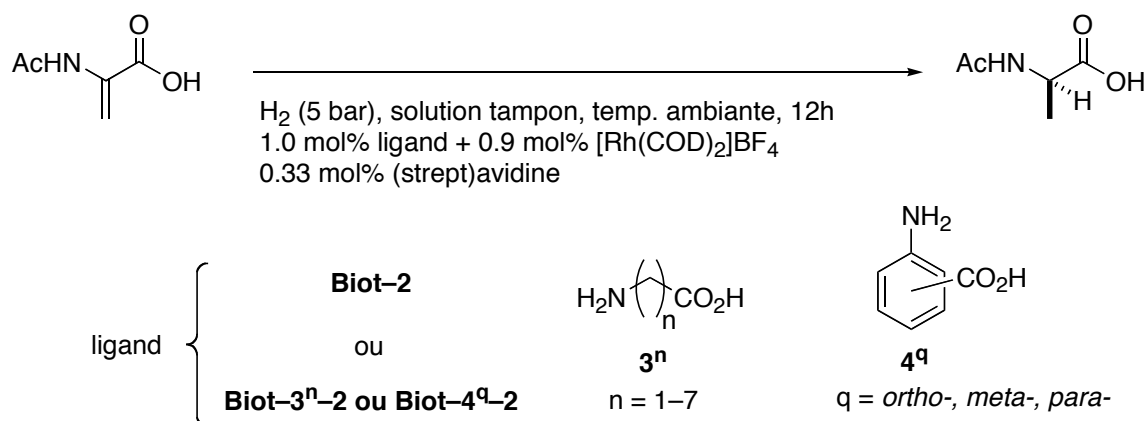


Figure 73. Hydrogénation énantiosélective de l'acide α -acétamidoacrylique par des complexes de types $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^n\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$ et $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-4}^q\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$ dans la (strept)avidine.

Chaque expérience de catalyse a été testée à pH neutre et à pH acide. Seul figure dans le Tableau 19 le meilleur excès énantiomérique obtenu.

Lorsque l'avidine est utilisée comme inducteur chiral, la sélectivité du nouveau complexe sans espaceur $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$ est de 0% (entrée 1, tableau 19). Cependant, une très forte augmentation de l'excès énantiomérique est observée lorsque la glycine est utilisée comme espaceur (ee 66% (*S*), entrée 2). Ce résultat est quasi similaire à celui obtenu avec le complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^1\text{-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ (ee 60% (*S*), entrée 2, tableau 17). L'insertion d'un à deux groupements méthylènes supplémentaires via la β -alanine et l'acide aminobutyrique fait chuter l'excès énantiomérique: il est respectivement de 9% (*S*) et 6% (*S*) (entrées 3, 4). L'utilisation de l'acide valérique ($\mathbf{3}^4$) comme espaceur permet d'obtenir l'énantiomère (*R*) dans l'avidine avec un faible excès énantiomérique de 10% (entrée 5).

Entrées	Ligands biotinylés	Protéines	Tampon	Conversion (%)	ee (%)
1	Biot-2	avidine	MOPS	100	0 -
2	Bio-3¹-2	avidine	MOPS	100	66 (<i>S</i>)
3	Biot-3²-2	avidine	MOPS	100	9 (<i>S</i>)
4	Biot-3³-2	avidine	MOPS	100	6 (<i>S</i>)
5	Biot-3⁴-2	avidine	MOPS	100	10 (<i>R</i>)
6	Biot-3⁵-2	avidine	MOPS	100	6 (<i>S</i>)
7	Biot-3⁶-2	avidine	MOPS	100	5 (<i>S</i>)
8	Biot-3⁷-2	avidine	MOPS	100	0 -
9	Biot-4^{ortho}-2	avidine	MOPS	100	27 (<i>R</i>)
10	Biot-4^{méta}-2	avidine	MOPS	100	5 (<i>R</i>)
11	Biot-4^{para}-2	avidine	MOPS	100	16 (<i>R</i>)
12	Biot-2	streptavidine	acetate	55	20 (<i>S</i>)
13	Biot-3¹-2	streptavidine	acetate	100	42 (<i>R</i>)
14	Biot-3²-2	streptavidine	acetate	100	29 (<i>S</i>)
15	Biot-3³-2	streptavidine	acetate	100	15 (<i>R</i>)
16	Biot-3⁴-2	streptavidine	acetate	100	39 (<i>R</i>)
17	Biot-3⁵-2	streptavidine	acetate	100	4 (<i>R</i>)
18	Biot-3⁶-2	streptavidine	acetate	100	9 (<i>S</i>)
19	Biot-3⁷-2	streptavidine	acetate	98	3 (<i>S</i>)
20	Biot-4^{ortho}-2	streptavidine	acetate	100	23 (<i>S</i>)
21	Biot-4^{méta}-2	streptavidine	acetate	100	11 (<i>R</i>)
22	Biot-4^{para}-2	streptavidine	acetate	82	20 (<i>S</i>)

Tableau 19. Résultats de l'hydrogénation énantiosélective de l'acide α -acétamidoacrylique dans la (strept)avidine par des complexes de types $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^n\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$ et $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-4}^q\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$.

Dans la streptavidine, les excès énantiomériques sont plus faibles par rapport à ceux obtenus avec les complexes ayant le ligand bidenté **1** (94% ee (*R*), entrée 12, tableau 17). Le plus fort excès énantiomérique en faveur de l'énantiomère (*R*) est observé dans le cas de l'utilisation de la glycine comme espaceur (42% ee (*R*), entrée 13, tableau 19). La sélectivité du complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^2\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$ est de 29% en faveur de l'énantiomère (*S*) (entrée 14).

De la même façon que précédemment, dans les deux protéines, les excès énantiomériques sont très faibles avec les complexes $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^6\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$ et $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^7\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$ (ee < 9%).

Dans le cas de l'utilisation d'acides aminés aromatiques comme espaceurs, les meilleurs excès énantiomériques sont observés dans les deux protéines lorsque le ligand bidenté **2** se situe en position ortho: soit dans l'avidine 27% ee (*R*) et 23% ee (*S*) dans la streptavidine (entrées 9 et 20).

D'une façon générale, pour les complexes de types $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^n\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-4}^q\text{-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$ préparés à partir du nouveau chélate **2** (amine exocyclique rigide), l'avidine semble être un meilleur inducteur chiral que la streptavidine (Figure 74). Le meilleur excès énantiomérique obtenu est de 66% (*S*). Dans le cas du ligand bidenté **1** (amine endocyclique flexible), l'effet inverse est observé: la streptavidine est meilleur inducteur chiral. L'énantiomère (*R*) est obtenu avec 94% d'excès énantiomérique. Cependant, la formation préférentielle de l'énantiomère (*S*) dans l'avidine est beaucoup moins marquée dans les catalyses réalisées avec le chélate **2**: 27% d'excès énantiomériques sont obtenus en faveur de l'énantiomère (*R*). Quel que soit le type de ligands bidentés utilisés (**1** ou **2**), l'incorporation d'espaceurs à longues chaînes aliphatiques **3ⁿ** (n = 6 et 7) ne permet pas d'obtenir des excès énantiomériques élevés dans les deux protéines (ee < 9%). Au delà de n > 5, le complexe biotinylé semble être à l'extérieur de la protéine et catalyse la formation du racémate.

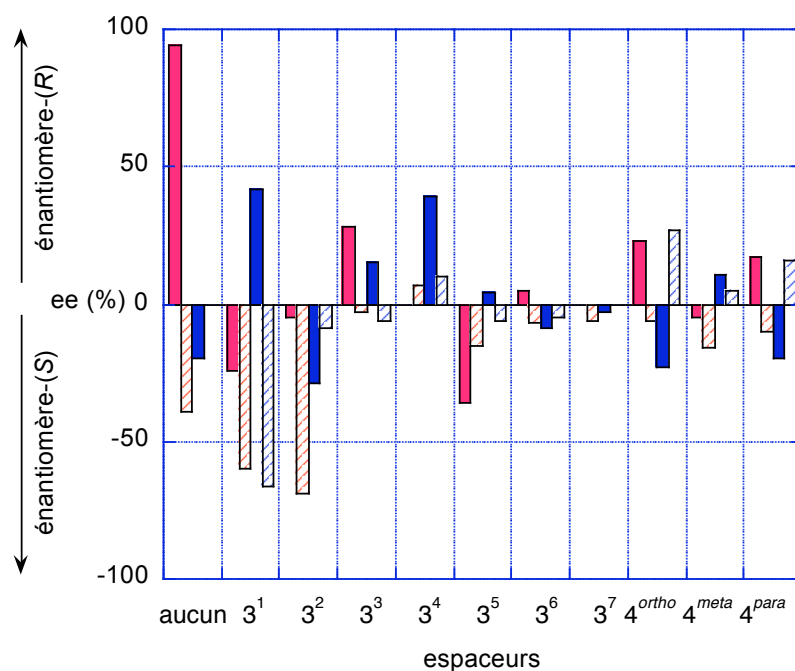


Figure 74. Graphique récapitulatif des résultats obtenus pour la réduction énantiosélective de l'acide acétamidoacrylique avec les ligands bidentés **1** (couleur rouge) et les ligands bidentés **2** (couleur bleu) dans la streptavidine (barre pleine) et dans l'avidine (barre achurées).

Ces expériences de catalyses ont permis de mettre en évidence l'effet de la taille de l'espaceur sur l'énantiosélectivité par incorporation d'acides aminés entre la biotine et le groupement aminodiphosphine, ainsi que l'influence de la conformation du chélate. Toutes ces modifications chimiques de la première sphère de coordination ont permis d'optimiser l'énantiosélectivité. Ainsi, l'énantiomère (*R*) peut être obtenu avec un excès énantiomérique de 94% dans la streptavidine et l'énantiomère (*S*) avec un excès énantiomérique de 69% dans l'avidine.

II.3.5. Modification génétique de la seconde sphère de coordination

II.3.5.1. Modification du point isoélectrique de l'avidine

Le principe repose sur la modification du point isoélectrique de l'avidine dite "wild type" (pI 10.4) par mutagenèse dirigée. En s'inspirant des travaux de M. Wilcheck et M. Kulomaa¹¹⁸, 4 mutations ont été réalisées sur la protéine par le Dr. A. Zocchi¹¹⁹ (Figure 75):

- K3E: la lysine (K) est substituée par le glutamate (E) en position 3
- K9D: la lysine (K) est substituée par l'aspartate (D) en position 9
- R122A: l'arginine (R) est substituée par l'alanine (A) en position 122
- R124A: l'arginine (R) est substituée par l'alanine (A) en position 124

Ces mutations permettent de diminuer le point isoélectrique à 7.2. Cependant, l'ajout supplémentaire de 3 acides aminés (glutamate-alanine-glutamate) sur la position *N*-terminale contribue à faire chuter le point isoélectrique jusqu'à une valeur de 5.4. Ainsi la nouvelle protéine recombinante (rec) glycosylée (G) recGAvi possède un point isoélectrique plus bas que celui de l'avidine "wild type". Cette protéine est sécrétée par la levure *Pichia Pastoris*¹²⁰. La production est d'environ 330 mg/L de culture.

Etant donnée que les mutations apportées sont éloignées des sites actifs (Figure 75), ces dernières ne modifient vraisemblablement pas les propriétés de fixation du ligand biotinylé pour la protéine mutante. En effet, la constante d'affinité du complexe [Rh(**Biot-1**)(COD)]BF₄ recGAvi a été déterminée au laboratoire par J. Sauser et A. Loosli

et est de $10^{7.7} \text{ M}^{-1}$. Cette valeur est très proche de celle déterminée pour le complexe $[\text{Rh}(\text{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4 \square \text{Avidine}$ ($K = 10^{7.6} \text{ M}^{-1}$).

La protéine mutée recGAvi a été testée en catalyse. Les premiers essais ont été réalisés avec les complexes de type $[\text{Rh}(\text{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\text{Biot-2})(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\text{Biot-3}^n-1)(\text{COD})]\text{BF}_4$ et $[\text{Rh}(\text{Biot-3}^n-2)(\text{COD})]\text{BF}_4$ (où $n = 1, 2$) donnant les meilleurs excès énantiomériques dans l'avidine "wild type".

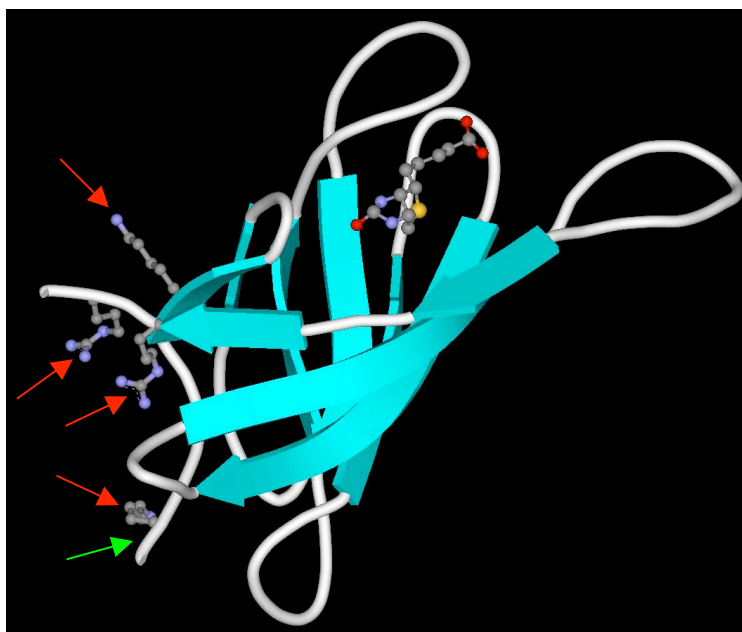


Figure 75. Représentation d'un site actif de l'avidine mutante recGAvi avec les mutations K3E, K9D, R122A, et R124A (indiquées par les flèches rouges). L'extrémité de la chaîne *N*-terminale est indiquée par une flèche verte. La biotine est représentée au centre de la cavité.

Le tableau 20 résume les résultats obtenus avec la protéine mutante (pI 5.4) dans la solution tampon MOPS (pH 7, 0.1 M), et rappelle les résultats obtenus dans l'avidine Belovo "wild type" (pI 10.4).

Pour les expériences de catalyses réalisées dans le MOPS (entrées 1–12, tableau 20), les conversions sont nettement plus faibles lorsque la protéine recGavi est utilisée comme inducteur chiral. La conversion est totale pour l'avidine "wild type" quel que soit le type de ligand utilisé mais chute jusqu'à 33 % avec la protéine mutante (entrée 4). Cependant, cette nouvelle protéine permet d'optimiser l'excès énantiomérique pour des réactions catalysées par les complexes $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^1-1)(\text{COD})]\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^1-2)(\text{COD})]\text{BF}_4$, et $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-3}^2-2)(\text{COD})]\text{BF}_4$. Les excès énantiomériques passent respectivement de 60 à 62% (*S*) (entrées 5, 6), de 66 à 77% (*S*) (entrées 7, 8) et de 9 à 14% (*S*) (entrées 11, 12)

Entrées	Ligands biotinylés	Tampon	pI	Conversion (%)	ee (%) (<i>S</i>)
1	Biot-1	MOPS	10.4	100	0
2	Biot-1	MOPS	5.4	57	4
3	Biot-2	MOPS	10.4	100	0
4	Biot-2	MOPS	5.4	33	0
5	Biot-3¹-1	MOPS	10.4	100	60
6	Biot-3¹-1	MOPS	5.4	85	62
7	Biot-3¹-2	MOPS	10.4	100	66
8	Biot-3¹-2	MOPS	5.4	85	77
9	Biot-3²-1	MOPS	10.4	100	69
10	Biot-3²-1	MOPS	5.4	65	54
11	Biot-3²-2	MOPS	10.4	100	9
12	Biot-3²-2	MOPS	5.4	95	14

Tableau 20. Résultats de l'hydrogénation énantiosélective de l'acide \square -acétamidoacrylique dans l'avidine "wild type" (pI = 10.4) et dans la recGavi (pI = 5.4) avec les ligands biotinylés **Biot-1**, **Biot-2**, **Biot-3ⁿ-1** et **Biot-3ⁿ-2** (où n = 1,2).

Etant donné que les mutations génétiques ont été effectuées loin du site actif et que les constantes d'affinité du complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$ sont identiques pour les deux protéines, cette hausse de l'excès énantiomérique provient vraisemblablement du processus de glycosylation qui diffère entre les deux protéines. L'avidine "wild type" Belovo est extraite du

blanc d'œuf de la poule. Or, dans les systèmes vivants (animaux, insectes, plantes ..) la glycosylation qui s'effectue dans le réticulum endoplasmique de la cellule est différente de celle effectuée dans les levures (comme la levure *Pichia Pastoris*)^{121,122}. Une des différences dans le processus de glycosylation réside dans l'addition de phosphate sur les résidus mannose chez la levure conduisant à la formation de phosphodiester¹²². La topographie de la protéine mutante est différente de celle de la protéine Belovo "wild type" (diversité dans la composition des sucres), ce qui se traduit par une meilleure induction chirale de la protéine recGA_{vi} pour l'hydrogénation asymétrique de l'acide α -acétamidoacrylique.

En conclusion, la modification génétique de l'avidine a permis de produire une nouvelle protéine mutante recGA_{vi} avec un point isoélectrique bas de 5.4. L'induction chirale de cette protéine sur la catalyse permet d'obtenir l'énantiomère (*S*) avec un excès énantiomérique de 77%. Cette valeur étant la plus haute obtenue jusqu'à présent pour l'énantiomère (*S*) (toutes protéines confondues: avidine et streptavidine). Des études sont en cours au sein du laboratoire sur le screening de tous les complexes décrits dans ce travail avec cette nouvelle protéine mutante.

II.3.5.2. Modification de la flexibilité de la boucle L 7,8 de la streptavidine

Notre attention s'est portée sur un acide aminé, la sérine 112, situé sur la boucle L 7,8 fermant le site de fixation de la biotine à la protéine. Cet acide aminé a la particularité de se situer à la jonction d'un feuillet β et de la boucle L 7,8. Afin de voir l'effet de la substitution de la sérine 112 par un autre acide aminé sur la catalyse, une mutation génétique a été réalisée. Elle a consisté à substituer la sérine par un autre acide aminé: la glycine. Ce dernier a la particularité de ne posséder aucune chaîne latérale (Figure 76). La streptavidine mutante S112G¹²³ est

exprimée dans la bactérie *Escherichia Coli*. La quantité produite est d'environ 85 mg/L de culture.

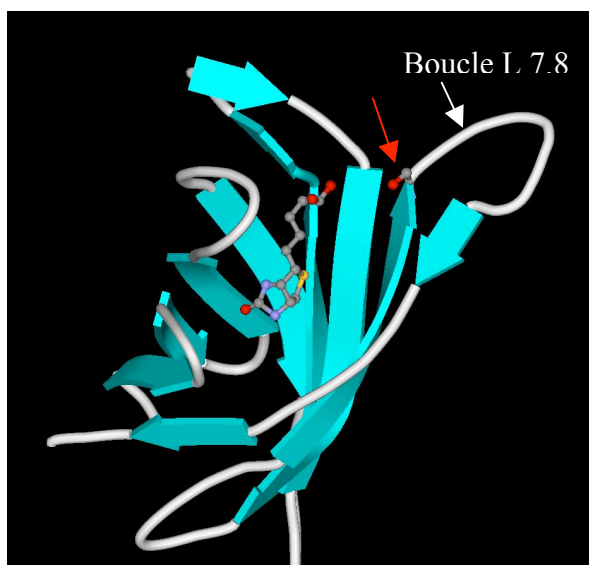


Figure 76. Représentation d'un site actif de la streptavidine mutante avec la mutation S112G (indiquée par une flèche rouge). La biotine est représentée au centre de la cavité.

L'hydrogénation asymétrique de l'acide α -acétamidoacrylique a été réalisée dans la nouvelle streptavidine mutante S112G en utilisant le complexe qui donne la meilleure sélectivité dans la streptavidine: $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$. Le résultat est décrit dans le Tableau 21 ci-dessous:

Entrées	Protéine	Conversion (%)	ee (%) (<i>R</i>)
1	Streptavidine	100	94
2	S112G	100	96

Tableau 21. Résultats de l'hydrogénation énantiosélective de l'acide acétamidoacrylique dans la streptavidine et la streptavidine mutante S112G par le complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})(\text{COD})]\text{BF}_4$.

La catalyse effectuée dans la protéine mutante S112G donne un résultat agréablement surprenant, puisque l'excès énantiomérique en faveur de l'énantiomère (*R*) augmente de 2 % (96%, entrée 2, tableau 21) par rapport au résultat de la catalyse réalisée dans la streptavidine "wild type" (94% entrée 1).

On peut émettre l'hypothèse selon laquelle, la glycine, de par son absence de chaîne latérale, confère une meilleure flexibilité de la boucle L 7,8, ce qui a pour effet d'apporter un environnement chiral favorable autour du complexe $[\text{Rh}(\mathbf{Biot-1})\text{COD}]\text{BF}_4$. De la même façon, que précédemment, des études sont en cours au sein du laboratoire sur le screening de tous les complexes décrits dans ce travail avec la streptavidine mutante S112G.

CHAPITRE III: CONCLUSION

III. Conclusion et Perspectives

Lors de ce travail de thèse, des métalloenzymes artificielles ont été élaborées en utilisant la technologie biotine–(strept)avidine. Les catalyseurs hybrides ont été obtenus par incorporation non-covalente de complexes organométalliques précurseurs dans des protéines hôtes. Des modifications chimiques (de la première sphère de coordination) et génétique (de la seconde sphère de coordination) des métalloenzymes ont été mises en œuvre pour l'optimisation de l'énantiosélectivité dans l'hydrogénation asymétrique de l'acide α -acétamidoacrylique. Ainsi l'énantiomère (*R*) de la *N*-acétamidoalanine a été obtenu avec un excès énantiomérique de 96% et l'énantiomère (*S*) avec un excès énantiomérique de 77%.

Ces résultats ont été possibles grâce à l'élaboration de métalloenzymes combinant les propriétés des catalyseurs homogènes et enzymatiques: i) un répertoire de réactions plus large (catalyse homogène), ii) une variété plus grande de substrat (catalyse homogène), iii) une sélectivité induite par la protéine (catalyse enzymatique), iv) des réactions effectuées sous conditions douces (catalyse enzymatique):

i) L'incorporation des complexes organométalliques s'effectue de façon supramoléculaire dans les sites actifs des protéines. Aucune modification chimique des résidus acides aminés de la protéine n'est nécessaire. Nous utilisons le principe "clef-serrure" (clef = substrat, serrure = enzyme) rencontré en catalyse enzymatique. Dans le cas de ces catalyseurs hybrides, la serrure est représentée par la protéine et la clef par la biotine. La flexibilité de ce procédé peut être mis à contribution pour réaliser d'autres réactions de catalyses en incorporant de nouveaux complexes dans la protéine. Ainsi il serait envisageable de réaliser d'autres réactions asymétriques: comme l'hydrogénation de cétones par des complexes biotinylés de

ruthénium, l'hydrogénation d'imines par des complexes biotinylés d'iridium, ou l'époxydation d'oléfines par des complexes biotinylés de manganèse.

ii) Des essais préliminaires avec l'acide (*Z*)-acétamidocinnamique, non relatés dans ce travail de thèse (ee 86% (*R*) dans la streptavidine), montrent que catalyse réalisée avec ces métalloenzymes artificielles se rapproche plus d'une catalyse homogène qu'enzymatique. Ces catalyseurs hybrides ont une tolérance beaucoup plus grande pour des substrats où l'encombrement stérique peut varier et permettent une application plus large pour l'hydrogénation asymétrique de substrats prochiraux.

iii) Le catalyseur achiral organométallique actif $[\text{Rh}(\text{ligand})(\text{COD})]\text{BF}_4$ génère la racémat. En l'incorporant dans l'environnement chiral d'une protéine, nous sommes parvenus à mimer une catalyse enzymatique en formant préférentiellement un seul énantiomère. Ainsi, l'avidine est utilisée comme inducteur chiral pour obtenir l'énantiomère (*S*) de la *N*-acétamidoalanine. La streptavidine permet d'obtenir l'énantiomère (*R*). L'utilisation en catalyse asymétrique de ces métalloenzymes artificielles permet de s'affranchir de la préparation fastidieuse de ligands bidentés chiraux.

iv) L'utilisation de protéines nous a permis d'élaborer des catalyses sous conditions douces (température, pression, pH). Un des avantages majeurs de ces catalyseurs hybrides est de travailler dans l'eau (les catalyses homogènes s'effectuent principalement dans des solvants organiques).

Les propriétés des catalyseurs hybrides empruntées à la catalyse homogène et à la catalyse enzymatique sont résumés ci-dessous (Figure 77):

	Catalyse homogène		Catalyse hybride		Catalyse enzymatique
Enantiomère	2 énantiomères	⇒	2 énantiomères	⇐	Un énantiomère
Réactions	Large répertoire	⇒	Large répertoire		Faible répertoire
Substrats	Grande variété	⇒	Grande variété		Faible variété
Solvants	Organiques		Eau	⇐	Eau
Seconde sphère de coordination	Mal définie		Bien définie	⇐	Bien définie
Optimisation	Chimique	⇒	Chimique et Génétique	⇐	Génétique

Figure 77. Caractéristiques de la catalyse hybride: homologie entre catalyse homogène et catalyse enzymatique (indiquée par une flèche).

Dans le domaine de la catalyse, deux faits marquants sont à noter: d'une part l'importante croissance des problèmes liés à l'environnement (chimie propre) et d'autre part le rapprochement entre le génie des procédés et de la catalyse. Dans le domaine industriel, la chimie propre repose sur des réactions à forte sélectivité et à faibles rejets de produits secondaires. L'atout majeur des métalloenzymes artificielles que nous avons développées réside dans leur utilisation en solution aqueuse. Nous avons également montré la très forte sélectivité de ces catalyseurs hybrides (ee 96%). Leur potentielle utilisation dans l'industrie pourrait être envisagée. Le rapport substrat/catalyseur est d'environ à 1000/1 en industrie. Or à l'heure actuelle, les meilleures sélectivités avec nos métalloenzymes artificielles sont obtenues avec un rapport substrat/catalyseur de 100/1. Ces résultats sont encourageants, mais des efforts dans ce domaine doivent être maintenus afin de réduire les coûts engendrés par l'utilisation de protéines. La concentration du substrat doit être élevée en industrie: cela permet d'effectuer des réactions multiphasiques où le substrat est à l'état solide avec une très faible solubilité aqueuse: la suspension de substrat est convertie en une suspension de produit.

Dans le cas de nos catalyses, la concentration du substrat est encore faible (seulement 5.6 mM), ce qui peut freiner une éventuelle application industrielle. Lors de ce travail de thèse, aucune étude concernant le recyclage du catalyseur n'a été effectuée. Sa récupération et son recyclage sont indispensables pour une application industrielle. À l'heure actuelle, il serait envisageable de récupérer le catalyseur hybride par filtration sur membrane sélective. Cependant cette manipulation s'effectuerait sous atmosphère inerte; ce qui diminuerait la souplesse d'emploi de ces métalloenzymes artificielles pour des applications industrielles.

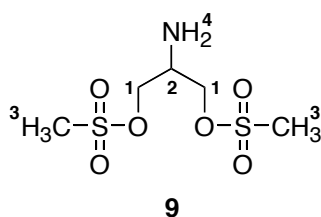
L'utilisation de ces métalloenzymes artificielles basées sur la technologie biotine–(strept)avidine sont encore à l'étude expérimentale mais ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la catalyse énantiosélective. Plusieurs projets sont en cours au laboratoire en utilisant les différentes propriétés de ces nouveaux catalyseurs hybrides: comme le transfert d'hydrogénation de cétones, l'oxydation asymétrique d'alcool en utilisant les propriétés hydrophobes des sites actifs des protéines. Des études cinétiques et cristallographiques de ces nouvelles métalloenzymes artificielles sont en cours.

CHAPITRE IV: PARTIE EXPERIMENTALE

General: ^1H , ^{13}C and ^{31}P spectra were obtained on a Varian 200 MHz and on a Bruker 400 and 500 MHz. The ^1H , ^{13}C assignments are based on COSY, DEPT and HETCOR experiments. Chemical shifts are reported in ppm (parts per million). Signals are quoted as s (singulet), d (doublet), t (triplet), br (broad), and m (multiplet). Electron Spray Ionization Mass Spectra (ESI-MS) were recorded on a Finnigan spectrometrer using a quadrupole ion trap. The relative intensities are given in parenthesis (%). The presence of oxidized forms of ligands in mass spectra is due to their air-sensitivity during the experiment. All reactions and purification steps involving phosphines were performed under a nitrogen atmosphere using standard Schlenk techniques. All biotinylated compounds are revealed as red spots on TLC with a solution of DACA (4-dimethylaminocinnamaldéhyde) in methanol containing 2% of H_2SO_4 conc. Compounds H-1, H-2, 5, 6, 7, 8, 9, 24, 26-29 were prepared according to literature protocoles^{90-92,94,97-99}.

Compound 9 (methanesulfonic acid 2-amino-3-methanesulfonyloxypropyl ester) (yield: 63%):

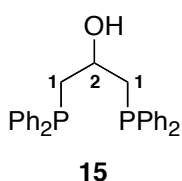
TFA was added (4.4 mL, 58 mmol) to a solution of compound 7 (1g, 2.9 mmol) dissolved in dichloromethane (100 mL) at 0°C . The solution was stirred for 1h. After warming to room temperature and stirring for 2 hrs, the solution was concentrated under vaccum. The resulting residue was dissolved in a minimum of dichloromethane and precipitated after the addition of diethylether to give a white solid.



^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 3.29 (s, 6H, H^3), 3.93 (m, 1H; H^2), 4.42 (m, 4H, H^1 , H^3), 8.56 (br, 2H, H^4); ^{13}C NMR (50.3 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 37.6 (CH_3), 49.2 (CH), 67.2 (CH_2).

Compound 15 (1,3-bis(diphenylphosphino)–2–propanol) (yield: 71%):

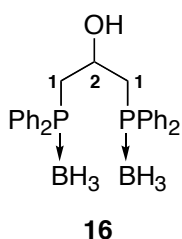
Diphenylphosphine (1 ml, 5.7 mmol) was dissolved in dried THF (100 mL) and deprotonated by the dropwise addition of *n*BuLi (4.3 mL, 6.8 mmol) at -70°C . This solution was stirred for 30 min. After warming to room temperature, the red solution was stirred for 30 min. Meanwhile, epichlorohydrin **14** (0.21 mL, 2.73 mmol) was dissolved in THF (15 mL) and added slowly (2 hrs) to the red solution. The solvent was then evaporated under vacuum and the residue was suspended in ethylacetate (100 mL) and water (100 mL) was added. The organic phase was separated, and dried with MgSO_4 . The solvent was evaporated under vacuum and the residue was purified by column chromatography on silica gel using hexane:ethylacetate (7:1) as eluent.



^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 2.45 (m, 4H; H^1), 3.84 (m, 1H, H^2), 7.20-7.80 (m, 20H, ArH); ^{13}C NMR (50.3 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 25.8 (CH_2), 52.7 (CH), 129.4-133.0 (Ar-H), 133.2-134.1 (Ar-C); ^{31}P NMR (80.9 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = -22.6 ppm

Compound 16 (1,3-bis(diphenylphosphino)–2–propanol–borane) (yield: 80%):

The complex $\text{BH}_3 \cdot \text{S}(\text{CH}_3)_2$ (1.97 mL, 20.5 mmol) was gently added to a solution of compound **15** (2.9g, 6.8 mmol) in THF (20 mL). The solution was stirred at room temperature (1 hr) and concentrated under vacuum. The residue was suspended in ethylacetate (50 mL) and the excess of $\text{BH}_3 \cdot \text{S}(\text{CH}_3)_2$ was neutralized by the dropwise addition of 1N HCl (exothermic reaction). The organic phase was separated and evaporated under vacuum to give a white oil which solidified afterwards.

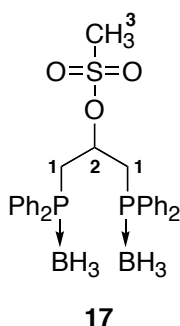


^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 2.50 (m, 4H; \mathbf{H}^1), 4.10 (m, 1H, \mathbf{H}^2), 7.00-7.70 (m, 20H, ArH); ^{31}P NMR (80.9 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 12.0 ppm (broad signal).

Compound 17 (methanesulfonic acid 2–diphenylphosphanyl–1–[(diphenylphosphanyl)–methyl]–ethyl ester–borane) (yield: 74%):

MeSOCl_2 (205 μL , 2.6 mmol) was gently added to a stirred suspension of compound **16** (2.2 mmol) and triethylamine (460 μL , 3.3 mmol) in dichloromethane (50 mL) at 0°C for 1 hr. After warming to room temperature, the solution was successively washed with 1N HCl (50 mL), water (50 mL), 10% aq Na_2CO_3 solution (50 mL) and brine (50 mL). The organic phase

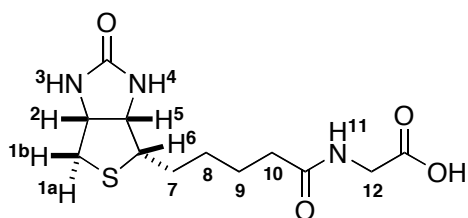
was dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated under vacuum to give a clear yellow solid which, when heated in hexane, afforded a white powder after cooling and filtration.



^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 2.46 (s, 3H, \mathbf{H}^3), 3.05 (m, 4H; \mathbf{H}^1), 5.18 (m, 1H, \mathbf{H}^2), 7.20-7.85 (m, 20H, ArH); ^{13}C NMR (50.3 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 33.4 (d, J = 5 Hz, CH_2), 33.7 (d, J = 5.5 Hz, CH_2), 38.7 (CH_3), 75 (CH), 129.1-132.8 (Ar-H), 133.2-134.3 (Ar-C); ^{31}P NMR (80.9 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 12.7 ppm (large signal).

General Procedure for the Synthesis of Biotinylated Aminoacid Precursors Biot-3¹⁻⁵ or Biot-4^{o,m,p}. Isobutyl chloroformate (0.32 mL, 2.47 mmol) was added to a solution of biotin (500 mg, 2.05 mmol) in DMF (40 mL) containing tri-*N*-butylamine (0.64 mL, 2.69 mmol). After 10 min at room temperature, the mixture was slowly added at 5 °C to a suspension of either an aliphatic aminoacid (4.1 mmol) ($\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}_2\text{H}$, $n = 1-5$) in DMF/water (1:1) (40 mL total) or an aromatic aminoacid (4.1 mmol) ($\text{NH}_2-(\text{C}_6\text{H}_4)^{o,m,p}-\text{CO}_2\text{H}$) in DMF (40 mL). After stirring at 5 °C for 2 hrs, the solvent was distilled under vacuum and the crude precipitate was dissolved in warm aqueous ethanol (1:1, 36 mL total). The mixture was acidified with 2.0 N HCl to pH 2 and kept at 0 °C for 12 hrs. The resulting precipitate was filtered, washed with water and dried under vacuum.

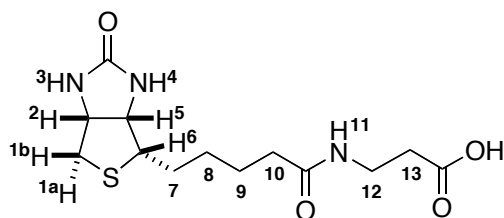
Biot-3¹ ([5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-acetic acid)
(yield: 81%):



Biot-3¹

¹H NMR (400 MHz, [D₆] DMSO, 20 °C): δ = 1.30-1.62 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 2.12 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.59 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.81 (dd, *J* = 12.3, 5.0 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.09 (m, 1H; **H**⁶), 3.70 (m, 2H; **H**¹²), 4.13 (m, 1H; **H**⁵), 4.30 (m, 1H; **H**²); ¹³C NMR (100.6 MHz, [D₆] DMSO, 20 °C): δ = 25.7 (CH₂), 28.9 (CH₂), 29.0 (CH₂), 35.7 (CH₂), 40.7 (CH₂-S), 41.3 (CH₂), 56.3 (CH-S), 60.1 (CH-N), 61.9 (CH-N), 163.6 (N-CO-N), 172.3 (CO-NH), 173.3 (CO₂H); ESI-MS for C₁₂H₁₉N₃O₄S: 646.9 (35) [2M+2Na]⁺, 625.0 (100) [2M+Na]⁺, 603.1 (22) [2M+H]⁺, 324.2 (28) [M+Na]⁺, 302.1 (67) [M+H]⁺.

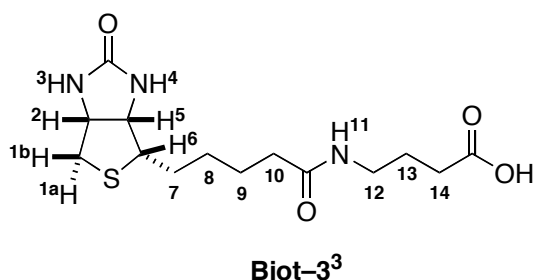
Biot-3² (3-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-propionic acid) (yield: 81%):



Biot-3²

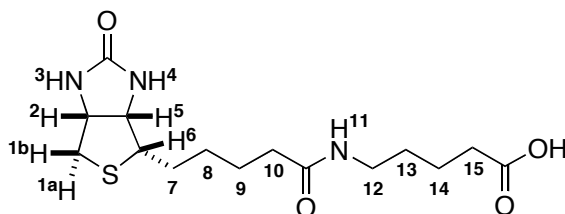
^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 1.20-1.67 (m, 6H; \mathbf{H}^7 , \mathbf{H}^8 , \mathbf{H}^9), 2.05 (m, 2H; \mathbf{H}^{10}), 2.36 (m, 2H; \mathbf{H}^{13}), 2.58 (d, J = 12.4 Hz, 1H; \mathbf{H}^{1a}), 2.82 (dd, J = 12.4, 5.0 Hz, 1H; \mathbf{H}^{1b}), 3.10 (m, 1H; \mathbf{H}^6), 3.20 (m, 2H; \mathbf{H}^{12}), 4.12 (m, 1H; \mathbf{H}^5), 4.32 (m, 1H; \mathbf{H}^2); 6.35 (br, 1H; \mathbf{H}^4), 6.45 (br, 1H; \mathbf{H}^3), 7.90 (br, 1H; \mathbf{H}^{11}); ^{13}C NMR (100.6 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 25.7 (CH_2), 28.9 (CH_2), 29.0 (CH_2), 34.8 (CH_2), 35.6 (CH_2), 35.9 (CH_2), 40.7 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 56.2 (CH-S), 60.1 (CH-N), 61.9 (CH-N), 163.6 (N-CO-N), 173.0 (CO-NH), 173.8 (CO_2H); ESI-MS for $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 330.1 (45) $[\text{M-H+O}]^-$, 314.2 (100) $[\text{M-H}]^-$.

Biot-3³ (4-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-butyric acid) (yield: 53%):



^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 1.20-1.67 (m, 8H; \mathbf{H}^7 , \mathbf{H}^8 , \mathbf{H}^9 , \mathbf{H}^{13}), 2.04 (m, 2H; \mathbf{H}^{10}), 2.20 (m, 2H; \mathbf{H}^{14}), 2.58 (d, J = 12.4 Hz, 1H; \mathbf{H}^{1a}), 2.82 (dd, J = 12.4, 5.0 Hz, 1H; \mathbf{H}^{1b}), 3.03 (m, 2H; \mathbf{H}^{12}), 3.10 (m, 1H; \mathbf{H}^6), 4.12 (m, 1H; \mathbf{H}^5), 4.30 (m, 1H; \mathbf{H}^2); 6.35 (br, 1H; \mathbf{H}^4), 6.45 (br, 1H; \mathbf{H}^3), 7.80 (br, 1H; \mathbf{H}^{11}); ^{13}C NMR (100.6 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 25.5 (CH_2), 26.2 (CH_2), 28.8 (CH_2), 29.1 (CH_2), 31.9 (CH_2), 36.0 (CH_2), 38.6 (CH_2), 40.7 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 56.3 (CH-S), 60.0 (CH-N), 61.9 (CH-N), 163.6 (N-CO-N), 172.8 (CO-NH), 175.1 (CO_2H); ESI-MS for $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 352.1 (10) $[\text{M+Na}]^+$, 330.1 (100) $[\text{M+H}]^+$.

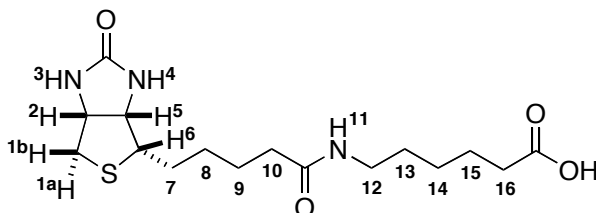
Biot-3⁴ (5-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-pentanoic acid) (yield: 73%):



Biot-3⁴

¹H NMR (400 MHz, [D₆] DMSO, 20 °C): δ = 1.20-1.70 (m, 10H; **H⁷**, **H⁸**, **H⁹**, **H¹³**, **H¹⁴**), 2.15 (m, 2H; **H¹⁰**), 2.20 (m, 2H; **H¹⁵**), 2.59 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H; **H^{1a}**), 2.82 (dd, $J = 12.4, 5.1$ Hz, 1H; **H^{1b}**), 3.00 (m, 2H; **H¹²**), 3.10 (m, 1H; **H⁶**), 4.10 (m, 1H; **H⁵**), 4.30 (m, 1H; **H²**); 6.35 (br, 1H; **H⁴**), 6.45 (br, 1H; **H³**), 7.75 (br, 1H; **H¹¹**); ¹³C NMR (100.6 MHz, [D₆] DMSO, 20 °C): δ = 22.2 (CH₂), 25.8 (CH₂), 28.9 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.1 (CH₂), 34.0 (CH₂), 36.0 (CH₂), 38.8 (CH₂), 40.7 (CH₂-S), 56.3 (CH-S), 60.1 (CH-N), 61.9 (CH-N), 163.6 (N-CO-N), 172.7 (CO-NH), 175.2 (CO₂H); ESI-MS for C₁₅H₂₅N₃O₄S: 344.2 [M+H]⁺.

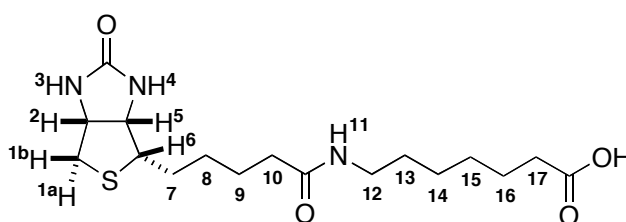
Biot-3⁵ (6-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-hexanoic acid) (yield: 75%):



Biot-3⁵

^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 1.20-1.60 (m, 12H; H^7 , H^8 , H^9 , H^{13} , H^{14} , H^{15}), 2.02 (m, 2H; H^{10}), 2.14 (m, 2H; H^{16}), 2.55 (d, J = 12.4 Hz, 1H; H^{1a}), 2.80 (dd, J = 12.4, 5.1 Hz, 1H; H^{1b}), 3.00 (m, 2H; H^{12}), 3.09 (m, 1H; H^6), 4.10 (m, 1H; H^5), 4.30 (m, 1H; H^2), 6.30 (s, 1H; H^4), 6.40 (s, 1H; H^3), 7.70 (br, 1H; H^{11}), 12.05 (br, 1H; CO_2H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 24.2 (CH_2), 25.3 (CH_2), 26.0 (CH_2), 28.0 (CH_2), 28.2 (CH_2), 28.9 (CH_2), 33.0 (CH_2), 35.0 (CH_2), 38.2 (CH_2), 39.9 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 55.4 (CH-S), 59.0 (CH-N), 61.0 (CH-N), 162.7 (N-CO-N), 171.8 (CO-NH), 174.5 (CO_2H); ESI-MS for $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 380.3 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 358.0 (55) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

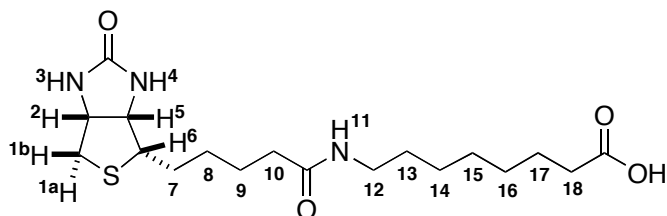
Biot-3⁶ (7-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl) -pentanoylamino]-heptanoic acid) (yield : 75%):



Biot-3⁶

^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 1.10-1.65 (m, 14H; H^7 , H^8 , H^9 , H^{13} , H^{14} , H^{15} , H^{16}), 2.15 (m, 2H; H^{10}), 2.20 (m, 2H; H^{17}), 2.60 (d, J = 12.4 Hz, 1H; H^{1a}), 2.80 (dd, J = 12.4, 5.1 Hz, 1H; H^{1b}), 3.00 (m, 2H; H^{12}), 3.15 (m, 1H; H^6), 4.10 (m, 1H; H^5), 4.30 (m, 1H; H^2); ^{13}C NMR (100.6 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 25.3 (CH_2), 26.2 (CH_2), 27.0 (CH_2), 28.9 (CH_2), 29.1 (CH_2), 29.2 (CH_2), 29.9 (CH_2), 34.5 (CH_2), 36.1 (CH_2), 39.2 (CH_2), 40.7 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 56.3 (CH-S), 60.1 (CH-N), 61.9 (CH-N), 163.6 (N-CO-N), 172.6 (CO-NH), 175.3 (CO_2H); ESI-MS for $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 370.3 (100) $[\text{M-H}]^-$.

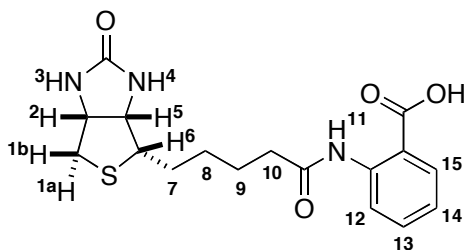
Biot-3⁷ (8-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-octanoic acid) (yield : 44%):



Biot-3⁷

¹H NMR (400 MHz, [D₆] DMSO, 20 °C): δ = 1.10-1.70 (m, 16H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹, **H**¹³, **H**¹⁴, **H**¹⁵, **H**¹⁶, **H**¹⁷), 2.12 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.2 (m, 2H; **H**¹⁸), 2.58 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.80 (dd, *J* = 12.4, 5.1 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.00 (m, 2H; **H**¹²), 3.10 (m, 1H; **H**⁶), 4.10 (m, 1H; **H**⁵), 4.30 (m, 1H; **H**²), 6.30 (br, 1H; **H**⁴), 6.40 (br, 1H; **H**³), 7.70 (br, 1H; **H**¹¹); ¹³C NMR (100.6 MHz, [D₆] DMSO, 20 °C): δ = 24.4 (CH₂), 25.3 (CH₂), 26.3 (CH₂), 28.0 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.4 (CH₂), 28.5 (CH₂), 29.1 (CH₂), 33.6 (CH₂), 35.2 (CH₂), 38.3 (CH₂), 39.8 (CH₂-S), 55.4 (CH-S), 59.2 (CH-N), 61.0 (CH-N), 162.7 (N-CO-N), 171.7 (CO-NH), 174.5 (CO₂H); ESI-MS for C₁₈H₃₁N₃O₄S: 408.3 (100) [M+Na]⁺, 386.2 (40) [M+H]⁺.

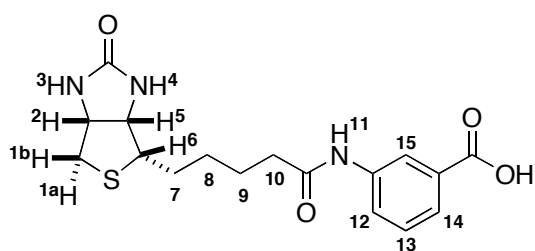
Biot-4^{ortho} (2-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-benzoic acid) (yield: 65%):



Biot-4^{ortho}

^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 1.30-1.80 (m, 6H; H^7 , H^8 , H^9), 2.40 (m, 2H; H^{10}), 2.60 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H; H^{1a}), 2.85 (dd, $J = 12.4, 5.0$ Hz, 1H; H^{1b}), 3.13 (m, 1H; H^6), 4.15 (m, 1H; H^5), 4.32 (m, 1H; H^2), 6.38 (s, 1H; H^4), 6.47 (s, 1H; H^3), 7.16 (m, 1H; H^{13}), 7.6 (m, 1H; H^{14}), 8.0 (m, 1H; H^{12}), 8.5 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H; H^{15}), 11.1 (br, 1H; CO_2H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 25.7 (CH_2), 28.9 (CH_2), 29.0 (CH_2), 38.2 (CH_2), 40.7 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 56.2 (CH-S), 60.1 (CH-N), 61.9 (CH-N), 117.2 (Ar-C), 120.8, (Ar-H) 123.4, (Ar-H), 131.9, (Ar-H) 134.9, (Ar-H), 141.8 (Ar-C), 163.6 (N-CO-N), 170.4 (CO-N), 172.1 (CO_2H); ESI-MS for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 362.2 $[\text{M-H}]^-$.

Biot-4^{meta} (3-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-benzoic acid) (yield: 70%):

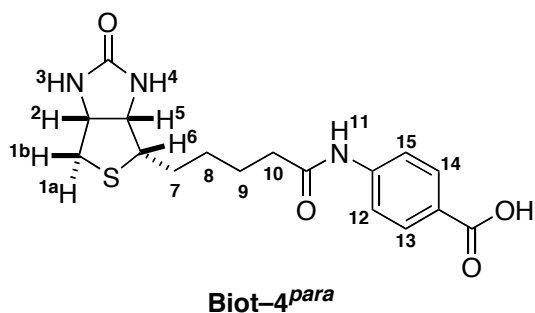


Biot-4^{meta}

^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 1.30-1.70 (m, 6H; H^7 , H^8 , H^9), 2.34 (m, 2H; H^{10}), 2.61 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H; H^{1a}), 2.83 (dd, $J = 12.4, 5.0$ Hz, 1H; H^{1b}), 3.16 (m, 1H; H^6), 4.16 (m, 1H; H^5), 4.32 (m, 1H; H^2), 6.38 (br, 1H; H^4), 6.46 (br, 1H; H^3), 7.42 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H; H^{13}), 7.61 (m, 1H; H^{12}), 7.84 (m, 1H; H^{14}), 8.25 (m, 1H; H^{15}), 10.15 (br, 1H; H^{11}), 12.80 (br, 1H; CO_2H); ^{13}C NMR (100.6 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, 20 °C): δ = 25.9 (CH_2), 29.0 (CH_2), 29.1 (CH_2), 37.1 (CH_2), 40.7 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 56.3 (CH-S), 60.1 (CH-N), 61.9 (CH-N), 120.6 (Ar-H),

124.0 (Ar-H), 124.6 (Ar-H), 129.8 (Ar-H), 132.1 (Ar-C), 140.4 (Ar-C), 163.6 (N-CO-N), 168.1 (CO-N), 172.3 (CO₂H); MS (ESI): ESI-MS for C₁₇H₂₁N₃O₄S: 362.2 [M-H]⁻.

Biot-4^{para} (4-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-benzoic acid) (yield: 74%):

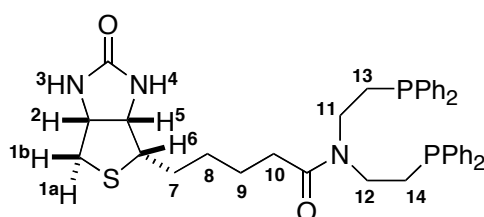


¹H NMR (400 MHz, [D₆] DMSO, 20 °C): δ = 1.30-1.70 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 2.36 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.61 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.84 (dd, *J* = 12.4, 5.0 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.13 (m, 1H; **H**⁶), 4.16 (m, 1H; **H**⁵), 4.32 (m, 1H; **H**²), 6.41 (br, 1H; **H**⁴), 6.50 (br, 1H; **H**³), 7.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H; **H**¹², **H**¹³), 7.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H; **H**¹⁴, **H**¹⁵), 10.20 (br, 1H; **H**¹¹), 12.68 (br, 1H; CO₂H); ¹³C NMR (100.6 MHz, [D₆] DMSO, 20 °C): δ = 25.8 (CH₂), 28.9 (CH₂), 29.1 (CH₂), 37.2 (CH₂), 40.7 (CH₂-S), 56.3 (CH-S), 60.1 (CH-N), 61.9 (CH-N), 119.1 (Ar-H), 125.7 (Ar-C), 131.2 (Ar-H), 144.2 (Ar-C), 163.7 (N-CO-N), 167.8 (CO-N), 172.6 (CO₂H); ESI-MS for C₁₇H₂₁N₃O₄S: 364.3 [M+H]⁺.

Synthesis of biotinylated ligands; general procedure: The biotinylated aminoacid **Biot-3¹⁻⁷** or **Biot-4^{o,m,p}** (0.7 mmol), the diphosphino-amine (H-1·HCl or H-2⁹⁸) (0.7 mmol) and CDMT (0.135 g, 0.77 mmol) were mixed in degassed acetonitrile (20 mL) and *N*-methylmorpholine (0.27 mL, 2.5 mmol) was added. The slurry was stirred overnight under reflux. After cooling to rt, water (50 mL) was added. This solvent mixture initially dissolved the suspension but

quickly generated a thick slurry as the product precipitated. After 3h stirring, the solvent was decanted and the oil was dried under vacuum to afford a white foam which was purified by column chromatography on silica gel 60 F₂₅₄ using chloroform:ethanol (7:1) as eluent.

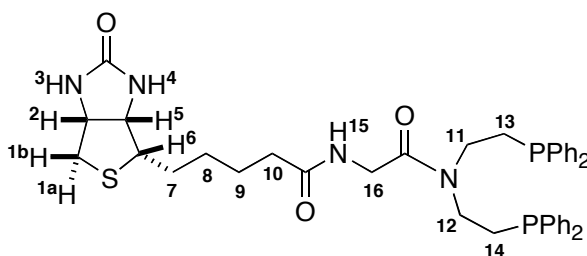
Biot-1 (5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-pentanoic acid bis-(2-diphenyl phosphanyl-ethyl)-amide (yield: 67%): The coupling between biotin and **H-1** was carried out using Whitesides' procedure to afford **Biot-1**^{90,91}.



Biot-1

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 1.46-1.74 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 1.96 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.20 (m, 2H; **H**¹²), 2.30 (m, 2H; **H**¹¹), 2.75 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.88 (dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.15 (m, 1H; **H**⁶), 3.25 (m, 2H; **H**¹⁴), 3.42 (m, 2H; **H**¹³), 4.24 (m, 1H; **H**⁵), 4.46 (m, 1H; **H**²), 5.25 (br, 1H; **H**⁴), 5.70 (br, 1H; **H**³), 7.25-7.50 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 25.0 (CH₂), 26.5 (d, *J* = 12.5 Hz; CH₂), 28.0 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.3 (CH₂), 32.6 (CH₂), 40.5 (CH₂-S), 43.6 (d, *J* = 28.1 Hz; CH₂), 45.3 (d, *J* = 29.0 Hz; CH₂), 55.3 (CH-S), 60.1 (CH-N), 61.8 (CH-N), 128.5-132.8 (Ar-H), 137.1-138.0 (Ar-C), 163.4 (N-CO-N), 172.3 (CO-N); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -20.2, -21.2; ESI-MS for C₃₈H₄₃N₃O₂P₂S: 668.3 [M+H]⁺.

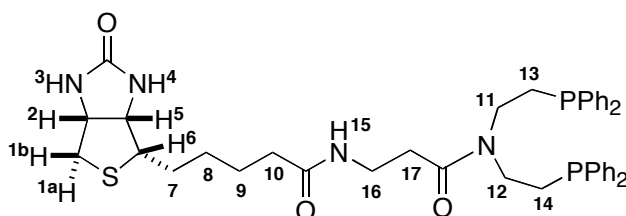
Biot-3¹-1 (5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoic acid {[bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-carbamoyl]-methyl}-amide) (yield: 54%):



Biot-3¹-1

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 1.30-1.70 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 2.10-2.25 (m, 6H; **H**¹⁰, **H**¹¹, **H**¹²), 2.64 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.79 (dd, *J* = 12.8, 5.0 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.04 (m, 1H; **H**⁶), 3.15 (m, 2H; **H**¹³), 3.32 (m, 2H; **H**¹⁴), 3.69 (m, 2H; **H**¹⁶), 4.21 (m, 1H; **H**⁵), 4.36 (m, 1H; **H**²), 7.20-7.70 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.5 (CH₂), 25.3 (d, *J* = 14.4 Hz; CH₂), 26.7 (d, *J* = 15.3 Hz; CH₂), 27.1 (CH₂), 27.2 (CH₂), 34.6 (CH₂), 39.4 (CH₂-S), 39.8 (CH₂), 42.9 (d, *J* = 24.9 Hz; CH₂), 43.5 (d, *J* = 25.9 Hz; CH₂), 54.5 (CH-S), 59.3 (CH-N), 60.8 (CH-N), 127.5-131.5 (Ar-H), 138.0-138.9 (Ar-C), 162.9 (N-CO-N), 167 (CO-NH), 172 (CO-N); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -20.0, -20.9; ESI-MS for C₄₀H₄₅N₄O₃P₂S: 741.3 (33) [M+H+O]⁺, 725.3 (100) [M+H]⁺.

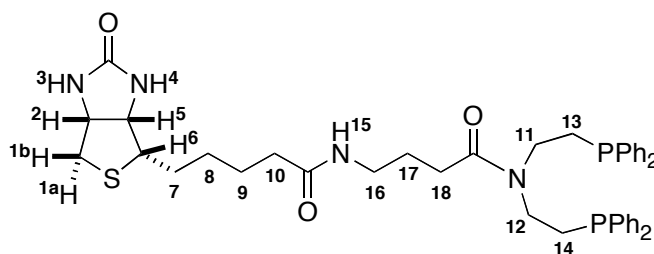
Biot-3²-1 (5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoic acid {2-[bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-carbamoyl]-ethyl}-amide) (yield: 32%):



Biot-3²-1

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 1.30-1.80 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 2.00-2.25 (m, 8H; **H**¹¹, **H**¹², **H**¹⁷, **H**¹⁰), 2.60 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.80 (dd, *J* = 12.6, 5.0 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.00 (m, 1H; **H**⁶), 3.15 (m, 2H; **H**¹³), 3.30 (m, 4H; **H**¹⁴, **H**¹⁶), 4.19 (m, 1H; **H**⁵), 4.36 (m, 1H; **H**²), 6.90-7.70 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.4 (CH₂), 25.5 (d, *J* = 13.4 Hz; CH₂), 26.8 (d, *J* = 14.8 Hz; CH₂), 27.0 (CH₂), 27.1 (CH₂), 31.5 (CH₂), 34.0 (CH₂), 34.9 (CH₂), 39.5 (CH₂-S), 42.4 (d, *J* = 23.9 Hz; CH₂), 44.1 (d, *J* = 26.8 Hz; CH₂), 54.3 (CH-S), 59.1 (CH-N), 60.7 (CH-N), 127.5-131.7 (Ar-H), 136.1-136.8 (Ar-C), 163.0 (N-CO-N), 170.5 (CO-NH), 172.0 (CO-N); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -19.8, -21.0; ESI-MS for C₄₁H₄₇N₄O₃P₂S: 769.3 (23) [M+2O]⁺, 755.3 (35) [M+H+O]⁺, 739.3 (100) [M+H]⁺.

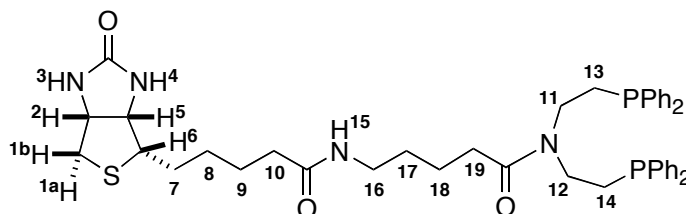
Biot-3³-1 (5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoic acid {3-[bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-carbamoyl]-propyl}-amide) (yield: 64%):



Biot-3³-1

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 1.20-1.72 (m, 8H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹, **H**¹⁷), 1.94 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.08 (m, 4H; **H**¹¹, **H**¹⁸), 2.19 (m, 2H; **H**¹²), 2.62 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.75 (dd, *J* = 12.8, 4.7 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.00 (m, 1H; **H**⁶), 3.06 (m, 2H; **H**¹⁶), 3.16 (m, 2H; **H**¹³), 3.31 (m, 2H; **H**¹⁴), 4.15 (m, 1H; **H**⁵), 4.36 (m, 1H; **H**²), 6.80-7.70 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 23.1 (CH₂), 24.1 (CH₂), 25.5 (d, *J* = 13.4 Hz; CH₂), 26.9 (CH₂), 27.2 (d, *J* = 14.6 Hz; CH₂), 27.2 (CH₂), 29.6 (CH₂), 34.9 (CH₂), 38.3 (CH₂), 39.5 (CH₂-S), 42.7 (d, *J* = 23.9 Hz; CH₂), 44.3 (d, *J* = 25.9 Hz; CH₂), 54.7 (CH-S), 59.3 (CH-N), 60.7 (CH-N), 118.0-131.5 (Ar-H), 135.9-136.5 (Ar-C), 163.2 (N-CO-N), 171.5 (CO-NH), 172.5 (CO-N); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -19.8, -20.8; ESI-MS for C₄₂H₄₉N₄O₃P₂S: 807.4 (35) [M+Na+2O]⁺, 791.4 (90) [M+Na+O]⁺, 775.4 (100) [M+Na]⁺.

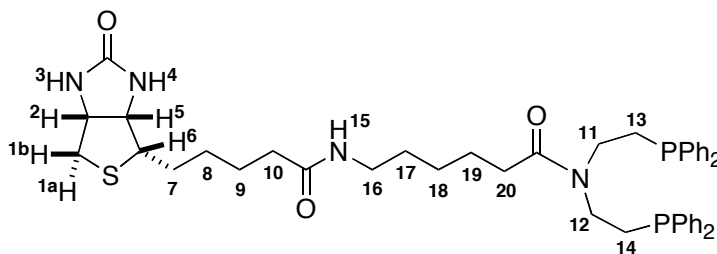
Biot-3⁴-1 (5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoic acid {4-[bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-carbamoyl]-butyl}-amide) (yield: 34%):



Biot-3⁴-1

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 1.20-1.68 (m, 10H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹, **H**¹⁷, **H**¹⁸), 1.87 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.13 (m, 4H; **H**¹⁹, **H**¹¹), 2.20 (m, 2H; **H**¹²), 2.64 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.75 (dd, *J* = 14.0, 5.0 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.00 (m, 1H; **H**⁶), 3.05-3.20 (m, 4H; **H**¹³, **H**¹⁶), 3.30 (m, 2H; **H**¹⁴), 4.20 (m, 1H; **H**⁵), 4.39 (m, 1H; **H**²), 6.50 (br, 1H; **H**⁴), 6.65 (br, 1H; **H**³), 7.20-7.70 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 21.1 (CH₂), 24.7 (CH₂), 25.5 (d, *J* = 13.4 Hz; CH₂), 26.8 (CH₂), 27.0 (CH₂), 27.1 (CH₂), 27.2 (CH₂), 31.3 (CH₂), 35.0 (CH₂), 37.9 (CH₂), 39.5 (CH₂-S), 42.5 (d, *J* = 23.9 Hz; CH₂), 44.2 (d, *J* = 25.9 Hz; CH₂), 54.6 (CH-S), 59.3 (CH-N), 60.6 (CH-N), 127.6-131.5 (Ar-H), 136.0-136.8 (Ar-C), 162.9 (N-CO-N), 171.4 (CO-NH), 172.3 (CO-N); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -19.5, -20.8; ESI-MS for C₄₃H₅₁N₄O₃P₂S: 783.3 (16) [M+H+O]⁺, 767.3 (100) [M+H]⁺.

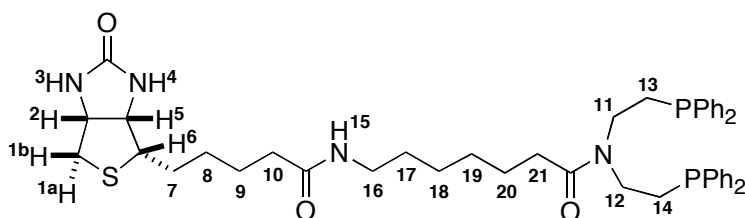
Biot-3⁵-1 (6-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]hexanoic acid bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-amide) (yield: 29%):



Biot-3⁵-1

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 0.90-1.70 (m, 12H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹, **H**¹⁷, **H**¹⁸, **H**¹⁹), 1.88 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.14 (m, 4H; **H**¹¹, **H**²⁰), 2.22 (m, 2H; **H**¹²), 2.66 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.78 (dd, *J* = 12.7, 4.7 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.03 (m, 1H; **H**⁶), 3.11-3.21 (m, 4H; **H**¹⁶, **H**¹³), 3.32 (m, 2H; **H**¹⁴), 4.20 (m, 1H; **H**⁵), 4.40 (m, 1H; **H**²), 6.65 (br, 1H; **H**³), 7.15-7.65 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 23.4 (CH₂), 24.7 (CH₂), 25.5 (d, *J* = 11.5 Hz; CH₂), 27.0 (CH₂), 27.1 (d, *J* = 14.4 Hz; CH₂), 27.2 (CH₂), 27.9 (CH₂), 28.6 (CH₂), 31.8 (CH₂), 34.8 (CH₂), 38.2 (CH₂), 39.4 (CH₂-S), 42.5 (d, *J* = 24.9 Hz; CH₂), 44.2 (d, *J* = 25.9 Hz; CH₂), 54.7 (CH-S), 59.4 (CH-N), 60.8 (CH-N), 127.7-131.7 (Ar-H), 136.0-136.8 (Ar-C), 163.0 (N-CO-N), 171.5 (CO-NH), 172.5 (CO-N); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -19.7, -21.1; ESI-MS for C₄₄H₅₃N₄O₃P₂S: 781.3 [M+H]⁺.

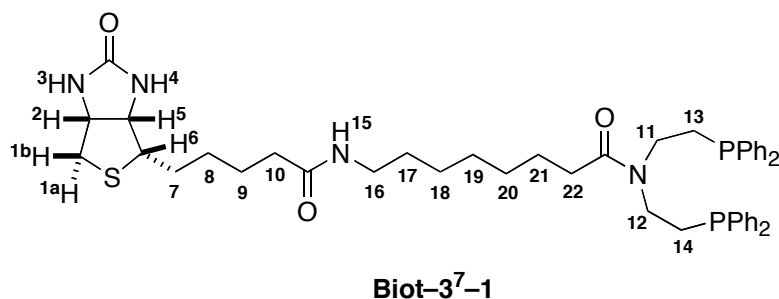
Biot-3⁶-1(7-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]heptanoic acid bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-amide) (yield: 36%):



Biot-3⁶-1

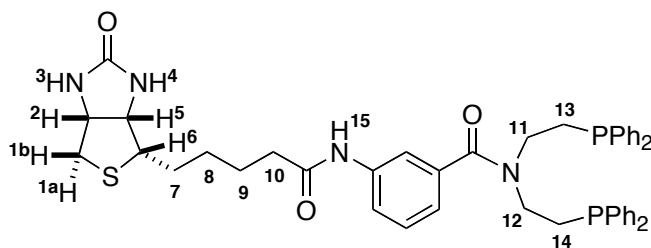
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 1.10-1.85 (m, 14H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹, **H**¹⁷, **H**¹⁸, **H**¹⁹, **H**²⁰), 1.95 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.15-2.35 (m, 6H; **H**¹¹, **H**¹², **H**²¹), 2.75 (d, J = 12.8 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.85 (dd, J = 12.8, 4.6 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.10 (m, 1H; **H**⁶), 3.15-3.30 (m, 4H; **H**¹⁶, **H**¹³), 3.40 (m, 2H; **H**¹⁴), 4.30 (m, 1H; **H**⁵), 4.50 (m, 1H; **H**²), 7.27-7.80 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 25.4 (CH₂), 25.7 (CH₂), 26.2 (CH₂), 27.1 (d, J = 13.6 Hz; CH₂), 28.4 (CH₂), 28.5 (m; CH₂), 28.6 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.6 (CH₂), 33.4 (CH₂), 36.2 (CH₂), 39.9 (CH₂), 40.8 (CH₂-S), 43.9 (d, J = 25.6 Hz; CH₂), 45.7 (d, J = 26.3 Hz; CH₂), 56.1 (CH-S), 60.7 (CH-N), 62.3 (CH-N), 128.8-133.3 (Ar-H), 137.4-138.4 (Ar-C), 164.6 (N-CO-N), 172.9 (CO-NH), 173.9 (CO-N); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -19.9, -21.0; ESI-MS for C₄₆H₅₇N₄O₃P₂S: 795.5 (17) [M+H]⁺, 817.5 (45) [M+Na]⁺, 849.4 (45) [M+2O+Na]⁺, 833.5 (100) [M+O+Na]⁺

Biot-3⁷-1 (8-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]octanoic acid bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-amide) (yield : 17%):



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 1.00-1.70 (m, 16H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹, **H**¹⁷, **H**¹⁸, **H**¹⁹, **H**²⁰, **H**²¹), 1.86 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.10 (m, 4H; **H**¹¹, **H**²²), 2.20 (m, 2H; **H**¹²), 2.65 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.79 (dd, *J* = 12.8, 4.8 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.03 (m, 1H; **H**⁶), 3.11-3.22 (m, 4H; **H**¹³, **H**¹⁶), 3.32 (m, 2H; **H**¹⁴), 4.20 (m, 1H; **H**⁵), 4.40 (m, 1H; **H**²), 6.40 (br, 1H; **H**⁴), 6.60 (br, 1H; **H**³), 7.18-7.90 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.0 (CH₂), 24.8 (CH₂), 25.5 (d, *J* = 14.4 Hz; CH₂), 25.7 (CH₂), 27.0 (CH₂), 27.1 (d, *J* = 15.3 Hz; CH₂), 27.2 (CH₂), 28.0 (CH₂), 28.2 (CH₂), 28.5 (CH₂), 32.1 (CH₂), 34.9 (CH₂), 38.6 (CH₂), 39.5 (CH₂-S), 42.5 (d, *J* = 24.0 Hz; CH₂), 44.3 (d, *J* = 25.9 Hz; CH₂), 54.6 (CH-S), 59.3 (CH-N), 60.8 (CH-N), 127.5-131.7 (Ar-H), 136.1-136.9 (Ar-C), 163.1 (N-CO-N), 171.6 (CO-NH), 172.4 (CO-N); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -19.9, -21.2; ESI-MS for C₄₆H₅₇N₄O₃P₂S: 863.5 (10) [M+Na+2O]⁺, 847.4 (35) [M+Na+O]⁺, 831.3 (45) [M+Na]⁺, 809.4 (100) [M+H]⁺.

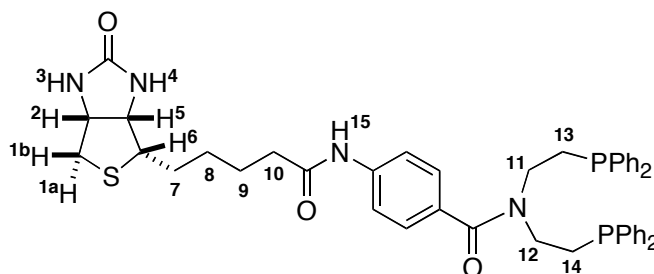
Biot-4^{meta}-1 (*N,N*-Bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-3-[5-(2-oxo-hexahydro-thieno [3,4 -d] imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-benzamide) (yield: 29%):



Biot-4^{meta}-1

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 1.20-1.72 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 2.10 (m, 2H; **H**¹¹), 2.24 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.35 (m, 2H; **H**¹²), 2.53 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.67 (dd, *J* = 12.6, 5.0 Hz, 1H; **H**^{1b}), 2.92 (m, 1H; **H**⁶), 3.20 (m, 2H; **H**¹³), 3.46 (m, 2H; **H**¹⁴), 4.07 (m, 1H; **H**⁵), 4.27 (m, 1H; **H**²), 6.70-7.70 (m, 24H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.5 (CH₂), 25.4 (d, *J* = 12.5 Hz; CH₂), 26.4 (d, *J* = 15 Hz; CH₂), 27.1 (CH₂), 27.2 (CH₂), 35.6 (CH₂), 39.4 (CH₂-S), 41.9 (d, *J* = 22.5 Hz; CH₂), 45.9 (d, *J* = 23.7 Hz; CH₂), 54.6 (CH-S), 59.4 (CH-N), 60.8 (CH-N), 116.0-131.7 (Ar-H), 135.6-138.4 (Ar-C), 163.4 (N-CO-N), 170.6 (CO-NH), 171.3 (CO-N); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -20.4, -20.8; ESI-MS for C₄₅H₄₈N₄O₃P₂S: 803.3 (15) [M+H+O]⁺, 787.3 (100) [M+H]⁺.

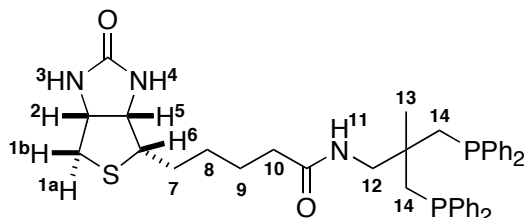
Biot-4^{para}-1 (*N,N*-Bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-4-[5-(2-oxo-hexahydro-thieno [3,4-d] imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-benzamide) (yield: 61%):



Biot-4^{para}-1

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 1.20-1.70 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 2.04 (m, 2H; **H**¹¹), 2.27 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.33 (m, 2H; **H**¹²), 2.57 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.73 (dd, *J* = 13.0, 4.7 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.00 (m, 1H; **H**⁶), 3.22 (m, 2H; **H**¹³), 3.48 (m, 2H; **H**¹⁴), 4.18 (m, 1H; **H**⁵), 4.36 (m, 1H; **H**²), 7.00-7.70 (m, 24H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.6 (CH₂), 25.6 (d, *J* = 12.5 Hz; CH₂), 26.8 (d, *J* = 13.7 Hz; CH₂), 27.0 (CH₂), 27.1 (CH₂), 35.6 (CH₂), 39.5 (CH₂-S), 41.9 (CH₂), 45.9 (CH₂), 54.7 (CH-S), 59.4 (CH-N), 60.8 (CH-N), 118.0-131.0 (Ar-H), 135.8-139.0 (Ar-C), 163.4 (N-CO-N), 170.6 (CO-NH), 171.5 (CO-N); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -19.6, -20.6; ESI-MS for C₄₅H₄₈N₄O₃P₂S: 801.2 (14) [M-H+O]⁺, 785.4 (100) [M-H]⁺.

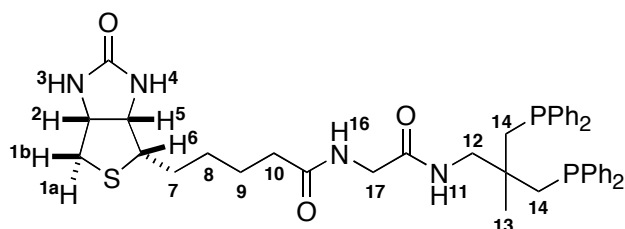
Biot-2 (5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,-d]imidazol-6-yl)-pentanoic acid [2-(2,2-diphenyl-ethyl)-2-methyl-4,4-diphenyl-butyl]-amide (yield: 69%): The synthesis of **Biot-2** was carried out using the same procedure as used for **Biot-1**, using the aminodiphosphine **H-2**.



Biot-2

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 0.90 (s, 3H; **H**¹³), 1.20-1.69 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 1.80 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.27 (m, 4H; **H**¹⁴), 2.60 (d, J = 12.7 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.76 (dd, J = 12.7, 4.9 Hz, 1H; **H**^{1b}), 2.96 (m, 1H; **H**⁶), 3.16 (m, 2H; **H**¹²), 4.09 (m, 1H; **H**⁵), 4.33 (m, 1H; **H**²), 4.95 (br, 1H; **H**⁴), 5.20 (br, 1H; **H**³), 5.80 (br, 1H; **H**¹¹), 7.10-7.70 (m, 20H; ArH); ^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 24.6 (CH_2), 25.1 (t, J = 8.6 Hz; CH_3), 27.0 (CH_2), 27.1 (CH_2), 35.1 (CH_2), 38.2 (m, Cq), 38.7 (m, CH_2), 38.9 (m, CH_2), 39.4 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 48.0 (t, J = 7.7 Hz; CH_2), 54.3 (CH-S), 59.1 (CH-N), 60.7 (CH-N), 127.5-132.2 (Ar-H), 138.3-138.4 (Ar-C), 162.4 (N-CO-N), 171.9 (CO-NH); ^{31}P NMR (161.9 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = -25.1; ESI-MS for $\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_2\text{P}_2\text{S}$: 698.3 (10) $[\text{M}+\text{H}+\text{O}]^+$, 682.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

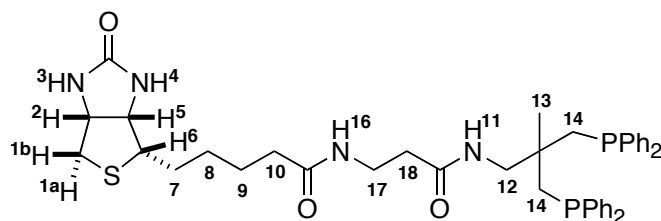
Biot-3¹-2 (5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoic acid {3-diphenyl phosphanyl-2-[(diphenylphosphanyl)-methyl]-2-methyl-propylcarbomoyl}-methyl)-amide (yield: 50%):



Biot-3¹-2

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 0.85 (s, 3H; **H**¹³), 1.20-1.70 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 2.20 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.32 (m, 4H; **H**¹⁴), 2.59 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.75 (dd, *J* = 12.7, 4.7 Hz, 1H; **H**^{1b}), 2.98 (m, 1H; **H**⁶), 3.17 (m, 2H; **H**¹²), 3.53 (m, 2H; **H**¹⁷), 4.15 (m, 1H; **H**⁵), 4.33 (m, 1H; **H**²), 5.87 (br, 1H; **H**³), 6.13 (br, 1H; **H**¹⁶), 6.95 (br, 1H; **H**¹¹), 7.10-7.70 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.4 (CH₂), 25.9 (t, *J* = 9.6 Hz; CH₃), 27.0 (CH₂), 27.1 (CH₂), 34.5 (CH₂), 38.2 (m, Cq), 38.6 (m, CH₂), 38.8 (m, CH₂), 39.5 (CH₂-S), 42.2 (CH₂), 48.2 (t, *J* = 8.64 Hz; CH₂), 54.6 (CH-S), 59.2 (CH-N), 60.6 (CH-N), 127.4-132.2 (Ar-H), 138.2-138.3 (Ar-C), 162.5 (N-CO-N), 169.0 (CO-NH), 172.9 (CO-NH); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -25.2; ESI-MS for C₄₁H₄₈N₄O₃P₂S: 755.3 (18) [M+H+O]⁺, 739.3 (100) [M+H]⁺.

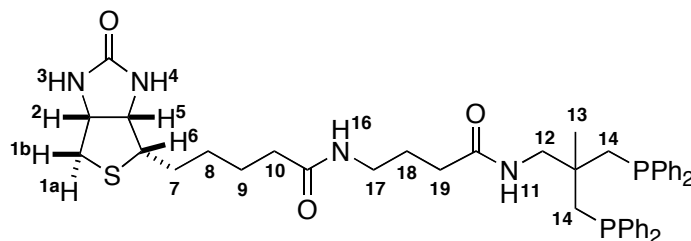
Biot-3²-2 (5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoic acid {2-[2-(2,2-diphenyl-ethyl)-2-methyl-4,4-diphenyl-butylcarbamoyl]-ethyl}-amide (yield: 38%):



Biot-3²-2

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 0.90 (s, 3H; **H**¹³), 1.25-1.65 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 1.95-2.35 (m, 8H; **H**¹⁰, **H**¹⁴, **H**¹⁸), 2.65 (d, J = 12.7 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.77 (dd, J = 12.7, 4.7 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.01 (m, 1H; **H**⁶), 3.15 (m, 2H; **H**¹²), 3.28 (m, 2H; **H**¹⁷), 4.18 (m, 1H; **H**⁵), 4.35 (m, 1H; **H**²), 7.10-7.70 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.1 (CH₂), 25.4 (CH₃), 26.8 (CH₂), 26.9 (CH₂), 34.3 (CH₂), 34.5 (CH₂), 34.7 (CH₂), 38.2 (m, Cq), 38.6 (m, CH₂), 39.1 (m, CH₂), 39.5 (CH₂-S), 48.2 (m, CH₂), 54.4 (CH-S), 59.2 (CH-N), 60.7 (CH-N), 127.5-132.2 (Ar-H), 138.0-138.3 (Ar-C), 162.9 (N-CO-N), 171.0 (CO-NH), 172.4 (CO-NH); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -24.6; ESI-MS for C₄₂H₅₀N₄O₃P₂S: 769.3 (23) [M+H+O]⁺, 753.3 (100) [M+H]⁺.

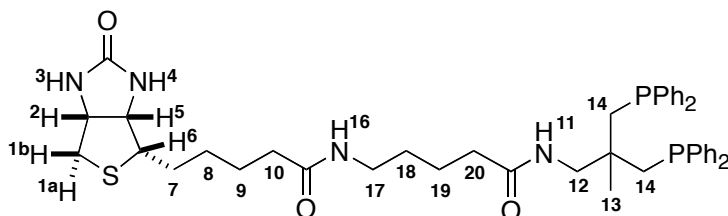
Biot-3³-2 (5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoic acid (3-{3-diphenylphosphanyl-2-[(diphenylphosphanyl)-methyl]-2-methyl-propylcarbamoyl}-propyl)-amide (yield: 49%):



Biot-3³-2

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 0.88 (s, 3H; **H**¹³), 1.30-1.70 (m, 8H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹, **H**¹⁸), 1.88 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.08 (m, 2H; **H**¹⁹), 2.28 (m, 4H; **H**¹⁴), 2.60 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.75 (dd, *J* = 12.7, 4.8 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.00 (m, 1H; **H**⁶), 3.09 (m, 2H; **H**¹²), 3.17 (m, 2H; **H**¹⁷), 4.15 (m, 1H; **H**⁵), 4.32 (m, 1H; **H**²), 5.50 (br, 1H; **H**⁴), 5.85 (br, 1H; **H**³), 6.68 (br, 1H; **H**¹⁶), 6.82 (br, 1H; **H**¹¹), 7.10-7.70 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.4 (CH₂), 24.6 (CH₂), 25.0 (t, *J* = 9.6 Hz; CH₃), 27.0 (CH₂), 27.2 (CH₂), 33.0 (CH₂), 34.9 (CH₂), 37.8 (CH₂), 38.2 (m, Cq), 38.7 (d, *J* = 8.6 Hz; CH₂), 38.9 (d, *J* = 9.6 Hz; CH₂), 39.5 (CH₂-S), 48.2 (t, *J* = 8.6 Hz; CH₂), 54.7 (CH-S), 59.2 (CH-N), 60.7 (CH-N), 127.5-132.0 (Ar-H), 138.3-138.5 (Ar-C), 163.2 (N-CO-N), 172.2 (CO-NH), 172.6 (CO-NH); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -25.4; ESI-MS for C₄₃H₅₂N₄O₃P₂S: 783.3 (8) [M+H+O]⁺, 767.3 (100) [M+H]⁺.

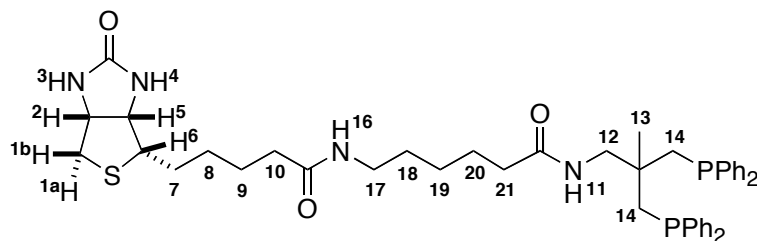
Biot-3⁴-2 (5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoic acid (4-{3-diphenylphosphanyl-2-[(diphenylphosphanyl)-methyl]-2-methyl-propylcarbamoyl}-butyl)-amide (yield: 20%):



Biot-3⁴-2

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 0.87 (s, 3H; **H**¹³), 1.25-1.65 (m, 10H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹, **H**¹⁸, **H**¹⁹), 1.80 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.07 (m, 2H; **H**²⁰), 2.26 (m, 4H; **H**¹⁴), 2.60 (d, J = 12.7 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.75 (dd, J = 12.7, 4.8 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.00 (m, 1H; **H**⁶), 3.05-3.20 (m, 4H; **H**¹², **H**¹⁷), 4.15 (m, 1H; **H**⁵), 4.35 (m, 1H; **H**²), 5.05 (br, 1H; **H**⁴), 5.78 (br, 1H; **H**³), 6.45 (br, 1H; **H**¹⁶), 6.55 (br, 1H; **H**¹¹), 7.10-7.70 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 21.2 (CH₂), 24.8 (CH₂), 25.1 (t, J = 8.6 Hz; CH₃), 27.0 (CH₂), 27.2 (CH₂), 27.7 (CH₂), 34.8 (CH₂), 35 (CH₂), 37.7 (CH₂), 38.2 (m, Cq), 38.8 (m, CH₂), 39.0 (m, CH₂), 39.5 (CH₂-S), 48.0 (t, J = 8.6 Hz; CH₂), 54.7 (CH-S), 59.2 (CH-N), 60.6 (CH-N), 127.5-132.2 (Ar-H), 138.2-138.4 (Ar-C), 163.1 (N-CO-N), 172.0 (CO-NH), 172.4 (CO-NH); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -25.1; ESI-MS for C₄₄H₅₄N₄O₃P₂S: 819.5 (45) [M+Na+O]⁺, 804.5 (48) [M+Na+H]⁺, 803.5 (100) [M+Na]⁺, 781.5 (7) [M+H]⁺.

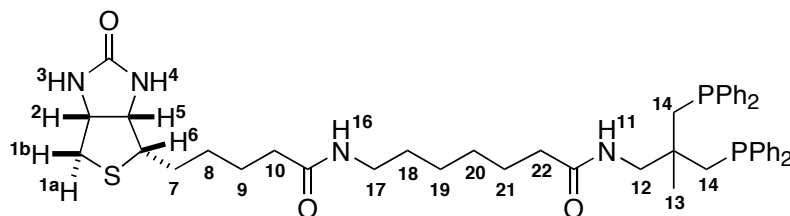
Biot-3⁵-2 (6-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-hexanoic acid {3-diphenylphosphanyl-2-[(diphenylphosphanyl)-methyl]-2-methyl-propyl}-amide (yield: 29%):



Biot-3⁵-2

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 0.89 (s, 3H; **H**¹³), 1.30-1.65 (m, 12H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹, **H**¹⁸, **H**¹⁹, **H**²⁰), 1.80 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.10 (m, 2H; **H**²¹), 2.28 (m, 4H; **H**¹⁴), 2.62 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.79 (dd, *J* = 12.8, 4.9 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.04 (m, 1H; **H**⁶), 3.10 (m, 2H; **H**¹⁷), 3.17 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H; **H**¹²), 4.18 (m, 1H; **H**⁵), 4.37 (m, 1H; **H**²), 5.00 (br, 1H; **H**⁴), 5.25 (br, 1H; **H**³), 6.09 (br, 1H; **H**¹⁶), 7.12-7.50 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.1 (CH₂), 24.5 (CH₂), 25.1 (t, *J* = 8.9 Hz; CH₃), 25.4 (CH₂), 26.9 (CH₂), 27.0 (CH₂), 28.0 (CH₂), 34.8 (CH₂), 35.5 (CH₂), 38.1 (CH₂), 38.2 (m, Cq), 38.7 (m, CH₂), 38.9 (m, CH₂), 39.5 (CH₂-S), 48.0 (t, *J* = 8.1 Hz; CH₂), 54.5 (CH-S), 59.1 (CH-N), 60.7 (CH-N), 127.5-132.2 (Ar-H), 138.0-138.7 (Ar-C), 163.0 (N-CO-N), 172.0 (CO-NH), 172.3 (CO-NH); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -25.1; ESI-MS for C₄₅H₅₆N₄O₃P₂S: 818.5 (70) [M+Na+H]⁺, 817.5 (100) [M+Na]⁺.

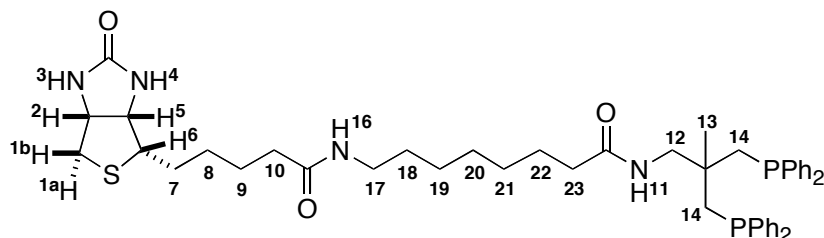
Biot-3⁶-2 (7-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-heptanoic acid{3-diphenylphosphanyl-2-[(diphenylphosphanyl)-methyl]-2-methyl-propyl}-amide) (yield : 26%):



Biot-3⁶-2

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 0.88 (s, 3H; **H**¹³), 1.10-1.70 (m, 14H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹, **H**¹⁸, **H**¹⁹, **H**²⁰, **H**²¹), 1.78 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.10 (m, 2H; **H**²²), 2.27 (m, 4H; **H**¹⁴), 2.62 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.78 (m, 1H; **H**^{1b}), 3.02 (m, 1H; **H**⁶), 3.10 (m, 2H; **H**¹⁷), 3.17 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, **H**¹²), 4.17 (m, 1H; **H**⁵), 4.37 (m, 1H; **H**²), 4.97 (br, 1H; **H**⁴), 7.20-7.70 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.1 (CH₂), 24.5 (CH₂), 25.1 (t, *J* = 9.6 Hz; CH₃), 25.5 (CH₂), 27.0 (CH₂), 27.1 (CH₂), 27.8 (CH₂), 28.3 (CH₂), 34.9 (CH₂), 35.6 (CH₂), 38.0 (CH₂), 38.3 (m, Cq), 38.8 (m, CH₂), 39.0 (m, CH₂), 39.5 (CH₂-S), 47.9 (t, *J* = 8.6 Hz; CH₂), 54.6 (CH-S), 59.2 (CH-N), 60.8 (CH-N), 127.5-132.2 (Ar-H), 138.3-138.5 (Ar-C), 163.2 (N-CO-N), 172.0 (CO-NH), 172.3 (CO-NH); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -25.1; ESI-MS for C₄₆H₅₈N₄O₃P₂S: 841.3 (10) [M+H+2O]⁺, 825.3 (20) [M+H+O]⁺, 809.3 (100) [M+H]⁺.

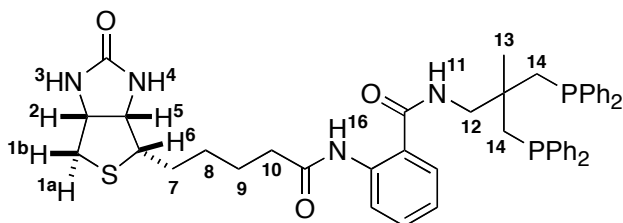
Biot-3⁷-2 (8-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-hexanoic acid {3-diphenylphosphanyl-2-[(diphenylphosphanyl)-methyl]-2-methyl-propyl}-amide) (yield: 24%):



Biot-3⁷-2

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 0.88 (s, 3H; **H**¹³), 1.10-1.67 (m, 16H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹, **H**¹⁸, **H**¹⁹, **H**²⁰, **H**²¹, **H**²²), 1.78 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.12 (m, 2H; **H**²³), 2.27 (m, 4H; **H**¹⁴), 2.63 (d, J = 12.3 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.77 (dd, J = 12.3, 4.6 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.02 (m, 1H; **H**⁶), 3.10 (m, 2H; **H**¹⁷), 3.15 (d, J = 6.7 Hz, 2H; **H**¹²), 4.20 (m, 1H; **H**⁵), 4.38 (m, 1H; **H**²), 4.95 (br, 1H; **H**⁴), 5.60 (br, 1H; **H**³), 6.16 (br, 1H; **H**¹⁶), 6.30 (br, 1H; **H**¹¹), 7.10-7.70 (m, 20H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.7 (CH₂), 24.6 (CH₂), 25.0 (t, J = 8.6 Hz; CH₃), 25.6 (CH₂), 27.0 (CH₂), 27.1 (CH₂), 27.9 (CH₂), 28.1 (CH₂), 28.5 (CH₂), 34.9 (CH₂), 35.7 (CH₂), 38.2 (CH₂), 38.4 (m, Cq), 38.7 (m, CH₂), 39.1 (m, CH₂), 39.5 (CH₂-S), 48.0 (t, J = 8.8 Hz; CH₂), 54.6 (CH-S), 59.2 (CH-N), 60.8 (CH-N), 127.5-132.2 (Ar-H), 137.8-138.5 (Ar-C), 162.9 (N-CO-N), 172.1 (CO-NH), 172.7 (CO-NH); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -25.5; ESI-MS for C₄₇H₆₀N₄O₃P₂S: 877.5 (10) [M+K+O]⁺, 861.5 (40) [M+K]⁺, 845.5 (100) [M+Na]⁺, 823.5 (25) [M+H]⁺.

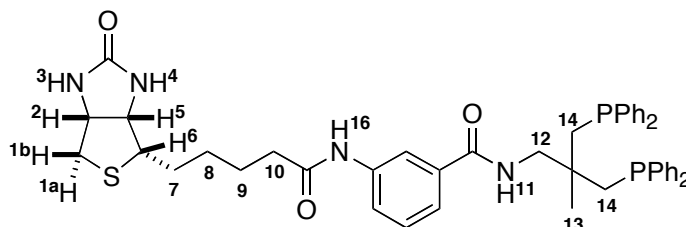
Biot-4^{ortho}-2 (*N*-{3-Diphenylphosphanyl-2-[(diphenylphosphanyl)-methyl]-2-methyl-propyl}-2-[5-(2-oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-benzamide (yield: 21%):



Biot-4^{ortho}-2

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 1.00 (s, 3H; **H**¹³), 1.30-1.75 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 2.26 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.36 (m, 4H; **H**¹⁴), 2.62 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.80 (dd, *J* = 12.4, 4.7 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.30 (m, 1H; **H**⁶), 3.40 (m, 2H; **H**¹²), 4.20 (m, 1H; **H**⁵), 4.38 (m, 1H; **H**²), 5.00 (br, 1H; **H**⁴), 5.55 (br, 1H; **H**³), 5.80 (br, 1H; **H**¹⁶), 6.70-8.50 (m, 24H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 24.3 (CH₂), 25.3 (t, *J* = 9.0 Hz; CH₃), 27.1 (CH₂), 27.2 (CH₂), 36.7 (CH₂), 38.5 (m, Cq), 39.0 (m; CH₂), 39.3 (m; CH₂), 39.5 (CH₂-S), 48.1 (t, *J* = 8.0 Hz; CH₂), 54.4 (CH-S), 59.0 (CH-N), 60.8 (CH-N), 120.3-132.2 (Ar-H), 138.1-138.4 (Ar-C), 162.2 (N-CO-N), 168.0 (CO-NH), 170.8 (CO-NH); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = -25.1; ESI-MS for C₄₆H₅₀N₄O₃P₂S: 817.3 (45) [M+H+O]⁺, 801.3 (100) [M+H]⁺.

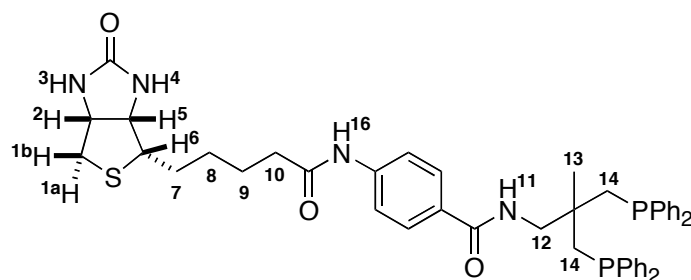
Biot-4^{meta}-2 (*N*-{3-Diphenylphosphanyl-2-[(diphenylphosphanyl)-methyl]-2-methyl-propyl}-3-[5-(2-oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-benzamide (yield: 22%):



Biot-4^{meta}-2

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 0.93 (s, 3H; H^{13}), 1.30-1.70 (m, 6H; H^7 , H^8 , H^9), 2.20-2.40 (m, 6H; H^{10} , H^{14}), 2.51 (d, J = 12.6 Hz, 1H; H^{1a}), 2.70 (dd, J = 12.6, 4.8 Hz, 1H; H^{1b}), 3.00 (m, 1H; H^6), 3.36 (m, 2H; H^{12}), 4.11 (m, 1H; H^5), 4.29 (m, 1H; H^2), 5.57 (br, 1H; H^4), 5.90 (br, 1H; H^3), 6.80-8.00 (m, 24H; ArH); ^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 24.5 (CH_2), 25.2 (CH_3), 26.9 (CH_2), 27.2 (CH_2), 35.7 (CH_2), 38.6 (m, Cq), 38.7 (m, CH_2), 39.2 (m, CH_2), 39.5 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 48.5 (CH_2), 54.7 (CH-S), 59.2 (CH-N), 60.7 (CH-N), 117.9-134.0 (Ar-H), 138.2-138.4 (Ar-C), 163.2 (N-CO-N), 166.7 (CO-NH), 171.0 (CO-NH); ^{31}P NMR (161.9 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = -24.9; ESI-MS for $\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_3\text{P}_2\text{S}$: 839.4 (49) $[\text{M}+\text{Na}+\text{O}]^+$, 803.3 (15) $[\text{M}+\text{H}+\text{O}]^+$, 787.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Biot-4^{para}-2 (*N*-{3-Diphenylphosphanyl-2-[(diphenylphosphanyl)-methyl]-2-methyl-propyl}-4-[5-(2-oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-benzamide (yield: 24%):

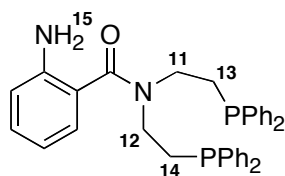


Biot-4^{para}-2

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 0.96 (s, 3H; \mathbf{H}^{13}), 1.30-1.70 (m, 6H; \mathbf{H}^7 , \mathbf{H}^8 , \mathbf{H}^9), 2.20-2.41 (m, 6H; \mathbf{H}^{10} , \mathbf{H}^{14}), 2.60 (d, J = 12.6 Hz, 1H; \mathbf{H}^{1a}), 2.75 (dd, J = 12.6, 4.6 Hz, 1H; \mathbf{H}^{1b}), 3.00 (m, 1H; \mathbf{H}^6), 3.40 (m, 2H; \mathbf{H}^{12}), 4.17 (m, 1H; \mathbf{H}^5), 4.40 (m, 1H; \mathbf{H}^2), 5.70 (br, 1H; \mathbf{H}^3), 6.40 (br, 1H; \mathbf{H}^{11}), 7.00-7.80 (m, 24H; ArH); ^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = 24.5 (CH_2), 25.2 (t, J = 7.6 Hz; CH_3), 27.0 (CH_2), 27.1 (CH_2), 35.8 (CH_2), 38.6 (m, Cq), 38.7 (m, CH_2), 39.2 (m, CH_2), 39.5 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 48.4 (CH_2), 54.7 (CH-S), 59.2 (CH-N), 60.7 (CH-N), 118.1-132.2 (Ar-H), 138.2-138.4 (Ar-C), 163.2 (N-CO-N), 166.1 (CO-NH), 171.3 (CO-NH); ^{31}P NMR (161.9 MHz, CDCl_3 , 20 °C): δ = -25.0; ESI-MS for $\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_3\text{P}_2\text{S}$: 800.3 (50) $[\text{M}]^-$, 799.3 (100) $[\text{M-H}]^-$.

4⁰-1 (2-Amino-*N,N*-bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-benzamide) (yield: 49%):

2-aminobenzoic acid (1.28 g, 2.7 mmol), the diphosphino-amine (H-1·HCl) (0.44 g, 3.24 mmol) and CDMT (0.62 g, 3.53 mmol) were mixed in degassed acetonitrile (30 mL) and *N*-methylmorpholine (1.28 mL, 11.5 mmol) was added. The slurry dissolved under reflux; and heating (80 °C) was maintained overnight. After cooling to rt, water (50 mL) was added causing the precipitation of the crude product **4⁰-1**. The oil was decanted and dried under vacuum. Column chromatography using chloroform allowed to elute unreacted diphosphino-amine H-1. The product was then eluted using chloroform/ethanol (10:1).

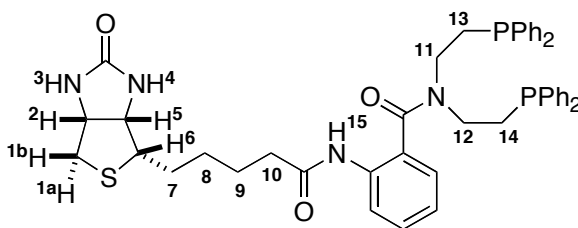


4⁰-1

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, -25 °C): δ = 2.09 (m, 2H; **H¹¹**), 2.32 (m, 2H; **H¹²**), 3.25 (m, 2H; **H¹³**), 3.50 (m, 2H; **H¹⁴**), 4.55 (br, 2H; **H¹⁵**), 6.50-7.70 (m, 24H; ArH); ¹³C NMR (125.7 Mhz, CDCl₃, -25°C) : δ = 25.4 (d, *J* = 12.5 Hz; CH₂), 26.2 (d, *J* = 14.4 Hz; CH₂), 41.8 (d, *J* = 21.1 Hz; CH₂), 45.5 (d, *J* = 26.8 Hz; CH₂), 119.7 (Ar-C), 127.9-131.6 (Ar-H), 135.4-136.2 (Ar-C), 169.8 (CO); ³¹P NMR (202.4 MHz, CDCl₃, -25 °C): δ = -20.6; ESI-MS for C₃₅H₃₄N₂OP₂: 583.2 (20) [M+H+2O]⁺, 577.2 (30) [M+H+O]⁺, 561.3 (100) [M+H]⁺.

Biot-4^{ortho}-1 (*N,N*-Bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-2-[5-(2-oxo-hexahydro-thieno [3,4-d]imidazol-6-yl)-pentanoylamino]-benzamide) (yield: 43%):

Biotin (0.234 g, 0.96 mmol), 2-Amino-*N,N*-bis-(2-diphenylphosphanyl-ethyl)-benzamide **4^{ortho}-1** (0.537 g, 0.96 mmol) and CDMT (0.185 g, 1.05 mmol) were mixed together in degassed acetonitrile (30 mL). The reaction was stirred for 10 min and *N*-methylmorpholine (0.38 mL, 3.45 mmol) was added. The slurry was stirred for 4 hrs under reflux. After cooling to rt, water (50 mL) was added causing the precipitation of the crude product **Biot-4⁰-1**. The oil was decanted and dried under vacuum. Column chromatography using chloroform/ethanol (10:1) allowed to isolate analytically pure **Biot-4^{ortho}-1**.



Biot-4^{ortho}-1

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 1.30-1.75 (m, 6H; **H**⁷, **H**⁸, **H**⁹), 2.18 (m, 2H; **H**¹¹), 2.35 (m, 2H; **H**¹⁰), 2.45 (m, 2H; **H**¹²), 2.65 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H; **H**^{1a}), 2.77 (dd, *J* = 12.6, 4.6 Hz, 1H; **H**^{1b}), 3.10 (m, 1H; **H**⁶), 3.40 (m, 2H; **H**¹³), 3.66 (m, 2H; **H**¹⁴), 4.17 (m, 1H; **H**⁵), 4.37 (m, 1H; **H**²), 6.28 (br, 1H, **H**¹⁵), 6.80-8.00 (m, 24H; ArH); ¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 20 °C): δ = 26.0 (CH₂), 26.9 (d, *J* = 13.6 Hz; CH₂), 28.0 (d, *J* = 18.4 Hz; CH₂), 28.5 (CH₂), 28.7 (CH₂), 37.3 (CH₂), 40.9 (CH₂-S), 42.9 (d, *J* = 24.2 Hz; CH₂), 47.4 (d, *J* = 26.3 Hz; CH₂), 56.1 (CH-S), 59.1 (CH-N), 60.6 (CH-N), 124.4-133.2 (Ar-H), 127.7 (Ar-C), 136.0-138.2 (Ar-C), 164.8 (N-CO-N), 170.8 (CO-NH), 172.6 (CO-N); ³¹P NMR (161.9 MHz, CDCl₃, 20

°C): Δ = -20.7, -21.2; ESI-MS for $C_{45}H_{48}N_4O_3P_2S$: 810.0 (45) $[M+Na+H]^+$, 809.0 (100) $[M+Na]^+$.

Hydrogenation protocol:

Considering the very small amounts of catalyst involved, we found that the reproducibility of the results critically depends on the care taken in the preparation of the catalytic runs. All organic and aqueous solutions were degassed by flushing argon through the solutions for *three hours*. All operations were performed either using standard Schlenk techniques or carried out in a glove box. The following buffers were screened: Acetate, pH 4.0 0.1 M final conc.; MOPS: 3-(*N*-Morpholino)propanesulfonic acid sodium salt pH 7.0, 0.1 M final conc.

The metal source $[Rh(COD)_2]BF_4$ (4 mg, 10 μ mol) was dissolved in DMSO (16 mL) and 2.5 mL of this solution (1.56 μ mol) was added to the appropriate aliquoted ligand (2.0155 μ mol). The solution was stirred at rt for 15 min. This solution can be stored and reused for several days without any noticeable loss of activity and of selectivity.

A glass tube (volume ca. 2 mL) was placed in an autoclave and charged with an acetamidoacrylic acid solution in water (260 μ L of a 23.8 mM solution, 6.2 μ mol). The protein solution in water was added (100 μ L of a 0.206 mM solution, 0.0207 μ mol of the tetramer). The buffer was then added to obtain a final volume of 1 mL with the desired buffer concentration (0.1 M). The catalyst solution in DMSO (100 μ L, 0.062 μ mol) was added last. The autoclave was closed, purged under vacuum and charged with H_2 at the desired pressure.

After stirring for 15 hrs at room temperature, the reaction was quenched by adjusting the pH to 2 with 2.0 N aqueous HCl solution. The aqueous solution was continuously extracted with ethyl acetate for 2 hrs and the organic phase was evaporated to a minimum volume (0.5 mL). The hydrogenation product (acetamidoalanine) was converted *in situ* to its methyl ester using trimethylsulfonium hydroxyde before GC analysis on Heptakis-2,3,6-perethyl- β -cyclodextrin, 22m x 0.32 mm column: He carrier gas: 3.2 mL/min, inlet injector 280 °C, oven 150 °C, FID detector 200 °C; retention time: (*S*)-*N*-acetylacetamidoalanine: 4.3 min, (*R*)-*N*-acetylacetamidoalanine: 4.7 min.

Hydrogenation protocole using phosphate buffer, pH 7.1, 0.07M final concentration: The metal source $[\text{Rh}(\text{COD})_2]\text{BF}_4$ (4 mg, 10 μmol) was dissolved in DMSO (8 mL) and 1.25 mL of this solution (1.55 μmol) was added to the appropriate aliquoted ligand (2.0155 μmol). A glass tube (volume ca. 2 mL) was placed in an autoclave and charged with an acetamidoacrylic acid solution in phosphate (1 mL of a 12.4 mM solution, 12.4 μmol). The protein solution in phosphate was added (1 mL of a 41.4 μM solution, 0.041 μmol). The catalyst solution in DMSO (100 μL , 0.124 μmole) was added last. The hydrogenation protocol and the ee determination were the same described previously.

CHAPITRE V: REFERENCES

1. G. Blaschke, H.P. Kraft, K. Fickentscher, F. Köhler, *Arzneim.-Forsch.* **1979**, *29*, 1640
2. W. S. Knowles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1998
3. R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008
4. K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2024
5. J.A. Osborn, F.S. Jardine, J.F. Young, G. Wilkinson, *J. Chem. Soc.* **1966**, 1711
6. H. B. Kagan, T. P. Dang, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6429
7. M.D. Fryzuk, B. Bosnich, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6262
8. M.D. Fryzuk, B. Bosnich, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5491
9. K. Achiwa, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 8265
10. H. Brunner, *Topics in Stereochemistry E. L. Eliel N. Y.* **1998**, *18*, 129
11. A. Togni, F. Spindler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4062
12. A. Miyashita, A. Yasuda, H. Takaya, K. Toriumi, T. Ito, T. Souchi, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7932
13. T. Ohkuma, H. Ooka, S. Hashiguchi, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2675
14. Y. Gao, R. M. Hanson, J. M. Klunder, S. Y. Ko, H. Masamune, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5765
15. B. E. Rossiter, T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 464

16. T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5975
17. H. Becker, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 448
18. H. C. Kolb, M. S. VanNieuwenhze, K. B. Sharpless, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483
19. W.H. Frishman, *New. Engl. J. Med.* **1981**, *305*, 500
20. E.J. Corey, J.O. Link, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 442
21. S. Miyano, L.D.L. Lu, S. M. Vili, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3608
22. L. Banfi, M. G. Beretta, L. Columbo, C. Gennari, C. Scolastico, *J. Chem.Soc. Perkin Trans. I*, **1983**, 1614
23. O. Reiser, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1996**, *35*, 1308
24. J. A. Bodkin, M. D. McLeod, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **2002**, 2733
25. G. Li, H.T. Chang, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1996**, *35*, 451
26. H. U. Blaser, F. Spindler, M. Studer, *Applied Catalysis A: general* **2001**, *221*, 119
27. J. Crosby, *Chirality in Industry I*, Wiley. New York, **1992**, 1
28. C. Gennari, U. Piarilli, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3071
29. E. M. Vogl, H. Gröger, M. Shibasaki, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1570
30. B. Jandeleit, D. J. Schaefer, T. S. Powers, H. W. Weinberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2494
31. K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*; 3rd ed.; Springer: Berlin, **1997**

32. F. Balkenhohl, K. Ditrich, B. Hauser, W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, 339, 381
33. A. Liese, M. V. Filho, *Curr. Opin. Biotech.* **1999**, 10, 595
34. G. Dauphin, J.-C. Gramain, A. Kergomard, M. F. Renard, H. Veschambre, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1980**, 318
35. H. Ohta, J. Konishi, G.I. Tsuchihashi, *Chem. Lett.* **1983**, 1895
36. H. Ohta, J. Konishi, G.I. Tsuchihashi, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, 665
37. K. Sakai, A. Nakazawa, K. Kondo, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, 2331
38. O. Schales, H. A. Graefe, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 4486
39. H. Ohta, N. Kobayashi, K. Ozaki, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 1802
40. H. Hashimoto, H. Simon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, 14, 106
41. M. T. Reetz, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 58, 6595
42. M.T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K.-E. Jaeger, *Angew.Chem. Int. Ed.* **1997**, 109, 2961
43. M.T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K.-E. Jaeger, *Angew.Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 2830
44. M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 407
45. K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. Del Cardayré, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamps, G. W. Huisman, *Angew.Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3948
46. A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, 13, 548

47. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, vol. 1, J.-M. Lehn Editor in Chief, Pergamon **1996**, 733
48. E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science* **1984**, 226, 505
49. G. M. Cooper, *La cellule – Une approche moléculaire*, Ed. De Boeck Université **1999**
50. L. Stryer, *Biochemistry*; 4th edition, 1995
51. G. De Santis, J. B. Jones, *Med. Chem.* **1999**, 7, 1381
52. B. G. Davis, *Curr. Opin. Biotech.* **2003**, 14, 379
53. R. R. Davies, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11643
54. M. T. Reetz, M. Rentzsch, A. Pletsch, M. Maywald, *Chimia* **2002**, 56, 721
55. I. D. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P. A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 9997
56. C. Rosano, P. Arosio, M. Bolognesi, *Biomol. Eng.* **1999**, 16, 5
57. [www. Belovo.com/prod03.htm](http://www.Belovo.com/prod03.htm)
58. N. M. Green, *Adv. Prot. Chem.* **1975**, 29, 85
59. G. Heney, O. Ga, *Anal. Biochem.* **1981**, 114, 92
60. N.M. Green, *Methods in Enzymology*, Academic Press : London, **1990**, 184, 51
61. M. Wilchek, E. A. Bayer, *Methods in Enzymology: Avidin-Biotin Technology*; Academic Press : San Diego, **1990**, 184

62. M. Wichek, E.A. Bayer, *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 1
63. O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**, *90*, 5076
64. D. Savage, G. Mattson, S. Desai, G. Nielander, S. Morgensen, E. Conklin, *Avidin-Biotin Chemistry: A handbook* ; Pierce Chemical Compagny, **1994**, 2nd edition
65. N.M. Green, M. A. Joynson, *Biochem. J.* **1970**, *118*, 71
66. L. Pugliese. A. Coda, M. Malcovati, M. Bolognesi, *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 698
67. B. Kuhn, P.A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3909
68. L. Pugliese, M. Malcovati, A. Coda, M. Bolognesi, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 42
69. N. M. Green, *Biochem. J.* **1963**, *89*, 585
70. S. Myamoto, P.A. Kolmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 8402
71. S. Freitag, I. Le Trong, A. Chilkoti, L.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 8402
72. J.D. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P.A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 9997
73. P.C. Weber, D. H. Ohlendorf, J.J. Wendoloski, F.R. Salemme, *Science* **1989**, *243*, 85
74. W.A. Hendrickson, A. Pähler, J.L. Smith, Y. Satow, E.A. Meritt, R.P. Phizackerley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 2190
75. S. Freitag, I. Le Trong, A. Chilkoti, I. A. Klumb, P.S. Stayton, R.E. Stenkamp, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 211

76. A. Chilkoti, P. H. Tan, P. S. Stayton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, 92, 1754
77. T. Sano, C.R. Cantor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, 92, 3180
78. S. Freitag, I. Le Trong, L.A. Klumb, V. Chu, A. Chilkoti, P.S. Stayton, R. E. Stenkamp, *Biomol. Eng.* **1999**, 16, 13
79. E. Morag, E.A. Bayer, M. Wilchek, *Biochem. J.* **1996**, 316, 193
80. J. W. Donovan, K.D. Ross, *Biochemistry* **1973**, 12, 512
81. M.J. Swamy, T. Heimbürg, D. Marsh, *Biophys. J.* **1996**, 71, 840
82. M. Gonzalez, C. E. Argaraña, G. D. Fidelio, *Biomol. Eng.* **1999**, 16, 67
83. H. Schettters, *Biomol. Eng.* **1999**, 16, 73
84. S. Dubel, F. Breitling, R. Kontermann, T. Schmidt, A. Skerra, M. Little, *J. Immunol. Methods*, **1995**, 178, 201
85. V. P. Hytönen, O. H. Laitinen, A. Grapputo, A. Kettunen, J. Savolainen, N. Kalkkinen, A. T. Marttila, H. R. Nordlund, T. K. M. Nypholm, G. Paganelli, M. S. Kulomaa, *Biochem. J.* **2003**, 372, 219
86. R. M. Buckland, *Nature* **1986**, 320, 557
87. M. Wilcheck, E. A. Bayer, *Anal. Biochem.* **1988**, 171, 1
88. M.E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 306
89. C. C. Lin, C.W. Lin, A. S. C. Chan, *Tetrahedron Asym.* **1999**, 10, 1887
90. E. Bayer, M. Wilchek, *Methods in Enzymology* **1990**, 184, 126

91. B. E. Wilson, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*:7, 2269
92. E. Benoist, A. Loussouarn, P. Remaud, J. F. Chatal, F. F. Gestin, *Synthesis* **1998**, *8*, 1113
93. T. W. Green, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd edition **1991**
94. C. E. Williamson, T. J. Sayers, A. M. Seligman, B. Witten, *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 511
95. K. Hayashi, C. Sato, S. Tamai, *European Patent Application* (EP 0717042A1) **1996**
96. J. Karas, G. Huttner, K. Heinze, P. Rutsch, L. Zsolnai, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, *5*, 405
97. C. Somlai, M. Berenyi, P. Maroy, *Z. Naturforsch.* **1993**, *48b*, 511
98. S.-T. Liu, C.-Y. Liu, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6079
99. V. W. Gash, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2197
100. G. Redeuilh, C. Secco, E.-E. Baulieu, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3996
101. B. Wolf, R. E. Grier, R.J. Allen, S.I. Goodman, C.L. Kien, *Clinica Chemica Acta* **1983**, *131*, 273
102. C.A. Mouton, D. Pang, C.V. Natraj, J.A. Shafer, *Biochem. Biophys.* **1982**, *218*, 101
103. C.E. Garrett, X. Jiang, K. Prasad, O. Repic, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4161
104. G. Kada, H. Falk, H. J. Gruber, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1427*, 33
105. G. Kada, K. Kaiser, H. Falk, H. J. Gruber, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1427*, 44

106. H. J. Gruber, G. Kada, M. Marek, K. Kaiser, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1381, 203
107. H. J. Lin, J. F. Kirsch, *Methods in enzymology* **1979**, 62, 287
108. Y. Pazy, T. Kulik, E. A. Bayer, M. Wilchek, O. Livnah, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 30892
109. P. S. Stayton, S. Freitag, L. A. Klumb, A. Chilkoti, V. Chu, J. E. Penzotti, R. To, D. Hyre, I. Le Trong, T. P. Lybrand, R. E. Stenkamp, *Biomol. Eng.* **1999**, 16, 39
110. T. Sano, C. R. Cantor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 142
111. D. H. Williams, E. Stephens, M. Zhou, *J. Mol. Biol.* **2003**, 329, 389
112. S. Meskers, J. M. Ruyschaert, E. Goormaghtigh, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5115
113. C.R Landis, J. Halpern, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 1746
114. R. Kuwano, M. Sawamura, Y. Ito, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2000**, 73, 2571
115. Y. Sun, R. N. Landau, J. Wang, C. Leblond, D. G. Blackmond, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1348
116. G. Hoge, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10219
117. T. Sano, C. R. Cantor, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 3369
118. A. T. Marttila, K. J. Airene, O. H. Laitinen, T. Kulik, A. E. Bayer, M. Wilchek, M. Kulomaa, *FEBS Lett.* **1998**, 441, 313
119. A. Zocchi, A. M. Jobé, J.-M. Neuhaus, T. R. Ward, *Prot. Expr. Purif.* **2003**, 32, 167

120. C. A. Scorer, J. J. Clare, W. R. McCombie, M. A. Romanos, K. Sreekrishna, *Biotechnology* **1994**, *12*, 181
121. *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Editor in Chief, Sir J. Kendrew, Blackwell Science ltd, **1994**.
122. R. K. Bretthausen, F. J. Castellino, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *39*, 193
123. J. Collot, J. Gradinaru, N. Humbert, M. Skander, A. Zocchi, T.R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9030