

Université de Lille

LILLE 1 – SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Ecole Doctorale des Sciences de la Matière, du Rayonnement et de
l'Environnement

Thèse de doctorat

Mention : Molécules et Matières Condensées

Marie GUEHL

**Nouveau concept de catalyse hybride pour la
transformation de la biomasse**

Soutenue le 27 février 2017

Composition du jury :

Claude Jolivald	Professeur des Universités	Université Pierre et Marie Curie Paris 6	Rapporteur
Sébastien Bontemps	Chargé de recherche	Université de Toulouse	Rapporteur
Karine Vigier de Oliveira	Maître de Conférences	Université de Poitiers	Examineur
Stéphane Ménage	Directeur de recherche CNRS	CEA	Examineur
Jean François Paul	Professeur des Universités	Université de Lille	Examineur
Damien Delcroix	Docteur de l'université	IFP Energies Nouvelles	Encadrant
Nicolas Lopes Ferreira	Docteur de l'université	IFP Energies Nouvelles	Encadrant
Mickaël Capron	Maître de Conférences	Université de Lille	Co-directeur
Franck Dumeignil	Professeur des Universités	Université de Lille	Directeur de thèse

Je dédie cette thèse à ma famille,
à Quentin,
à Mathéo.

Pour Jean-Claude et Camille qui me manquent tant.

« La théorie c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! »

Albert Einstein

Résumé

Dans le contexte énergétique actuel, de nouvelles filières de production renouvelables d'énergies, de matériaux et de carburants sont encouragées. Cette étude porte sur le développement du concept de catalyse hybride, combinaison 'one-pot' de la catalyse chimique et de la catalyse enzymatique. Ce type de catalyse innovant a été mis au service de la transformation quantitative de polyols de type sorbitol et mannitol en fructose, substrats d'intérêt pour une chimie biosourcée. Les enzymes de type alcool déshydrogénase permettent la transformation sélective des hexitols en fructose. Un paramètre qui limite l'utilisation de la catalyse enzymatique pour la chimie organique est l'utilisation de cofacteur d'enzyme coûteux en quantités stœchiométriques. Afin de lever ce verrou, la régénération de ce cofacteur par catalyse chimique ont été développée dans cette étude. De nombreux efforts ont ainsi porté sur la rationalisation de la 'cohabitation' entre ces deux systèmes catalytiques de type différent afin d'obtenir un système global performant optimisé. Nous avons montré que les deux systèmes peuvent être compatibles. En effet, le complexe organométallique ne semble pas constituer un 'poison' pour l'enzyme et les deux catalyseurs peuvent travailler dans des conditions de pH et température similaires. Le mécanisme de régénération du cofacteur par le complexe d'iridium a été étudié expérimentalement et à l'aide de la DFT.

Mots clés : catalyse hybride, régénération de cofacteur, valorization de biomasse

In the context of the depletion of fossil resources - in addition to the associated environmental issues - the use and the valorization of renewables for fuel, power, chemicals and materials is an important lever for ensuring environmental and economic sustainability. Enzymatic catalysis shows high efficiency and selectivity, and the interest of applying enzymes for organic synthesis is thus increasing. Enzymes such as alcohol dehydrogenase enable the regioselective transformation of polyols into sugars. One parameter that limits the practical application of enzymatic catalysis in organic reactions is the high cost of enzyme-specific cofactors [e.g., NAD(P)H used in stoichiometric proportions]. In the view of improving environmental and sustainability aspects, designing a green, sustainable, economic, and efficient regeneration method for NAD(P)H and NAD(P)⁺ is essential. Regeneration could then be envisioned using a chemical catalytic reaction. Combining these two kinds of catalysis, namely chemocatalysis and enzymatic catalysis falls under the scope of the so-called hybrid catalysis concept. In this study, we demonstrate the one-pot regeneration of NAD⁺ by chemo-catalysis with an organometallic complex to assist the reaction of conversion of hexitol to fructose using an alcohol dehydrogenase. A mechanism is investigated and the Density functional theory (DFT) calculations were carried out to describe the regeneration of NAD⁺ by an organo-iridium complex. Then we have demonstrated the chemical compatibility between the enzyme and the organometallic complex for the production of fructose.

Key words : hybrid catalysis, cofactor regeneration, biomass valorization

Abréviations

2G	Deuxième Génération
6-31G	Base de chimie quantique
APT	Attached Proton Test
B3LYP	Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr
CAL	Candida Antartica Lipase
d	doublet
dd	doublet de doublet
DFT	Théorie de la fonctionnelle de la densité
DKR	Résolution cinétique dynamique
DRX	Diffraction des Rayons X
E. C.	Commission des enzymes
FDH	Formate Déshydrogénase
GC	Chromatographie gazeuse
HF	Hartree Fock
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HPLiC	Chromatographie Liquide ionique Haute Performance
IFPEN	IFP Energies Nouvelles
Kcat	Constante catalytique d'une enzyme
Km	Constante de Michaelis
MDH	Mannitol déshydrogénase
MDR	Medium chain déshydrogénase réductase
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
λ	Longueur d'onde
LDR	Long chain déshydrogénase réductase
PEG	Polyéthylène Glycol
pH	Potentiel Hydrogène
PSLDR	Polyol specific long chain déshydrogénase réductase
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
RMN ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone
s	singulet

SDH	Sorbitol déshydrogénase
SDR	Short chain déshydrogénase réductase
T	Température
TBI	Triple Resonance Broad Band
TCD	Détecteur à Thermo-Conduction
TOF	TurnOver Frequency
TON	TurnOver Number
UCCS	Unité de catalyse et chimie du solide
UV-vis	Ultraviolet-visible
Vmax	Vitesse maximale
WET	Water suppression Enhanced through T1 effects

Table des matières

Résumés

Abréviations

Introduction générale.....1

Chapitre 1 Bibliographie

Introduction : Définitions 5

I Procédés chémoenzymatiques en one-pot : premiers pas vers la catalyse hybride 11

1. Catalyse organique et biocatalyse..... 11

2. Catalyse organométallique et biocatalyse 15

3. Catalyse hybride 19

3.1. Concept..... 19

3.2. Exemples de catalyse hybride 20

II Catalyse hybride, ou comment lever les verrous de la catalyse enzymatique avec la catalyse chimique..... 24

1. Transformation catalytique *in situ* de l'eau oxygénée 25

2 Régénération de cofacteurs 29

III Régénération de cofacteur par des complexes organométalliques..... 37

1 Catalyse organométallique biomimétique : mime d'enzymes et régénération de cofacteurs..... 37

2. Catalyse hybride de régénération de NADH 47

3. Régénération du NAD⁺ : exemple par mécanisme oxydatif 50

IV Choix du système d'étude et méthodologie de thèse.....52

Chapitre 2 Etudes des transformations enzymatiques

Introduction..... 57

I Sélection des biocatalyseurs modèles..... 59

1. Définitions 59

2 Critères de sélections des enzymes..... 59

3 Première enzyme modèle : Sorbitol déshydrogénase 60

4 Seconde enzyme modèle : Mannitol déshydrogénase 63

5 Réversibilité des réactions..... 67

II Caractérisations des réactions enzymatiques pour la production du fructose.....	69
1 Thermodynamique	69
2 Mise en œuvre des enzymes.....	71
2.1 Validation des conditions opératoires.....	71
2.2 Contrôles	71
3 Détermination de l'activité en fonction du pH.....	73
4 Détermination de l'activité des enzymes en fonction de la température	75
Conclusion	77
Partie expérimentale.....	78

Chapitre 3 Régénération du cofacteur par catalyse organométallique : étude combinée expérimentale et théorique

Introduction - Méthodologie.....	81
I Synthèse et caractérisations du complexe [(pentaméthylcyclopentadiène)Ir(phénantroline)(H ₂ O)] ²⁺	87
1 Synthèse	87
2 Caractérisations.....	87
2.1 Résonance magnétique nucléaire	87
2.2 Diffraction des rayons X	91
II Régénération du NAD ⁺	93
1 Suivi de la régénération par spectrométrie UV-visible	93
2 Suivi de la régénération par RMN	95
2.1 Résultats préliminaires : tests « blancs »	95
2.2 Oxydation stœchiométrique de NADH en NAD ⁺	98
2.3 Conditions catalytiques	100
2.4 Discussion	104
IV Etude du mécanisme.....	112
1 Présentation des conditions de calculs pour l'étude théorique	112
1.1 Equation de Schrödinger et approximations de la DFT	112
1.2 Méthode utilisée	113
2 Etude combinée DFT-expérimental du cycle catalytique autour du complexe d'iridium.....	115
Conclusion	122
Partie expérimentale.....	124

Chapitre 4 Impact du ligand phénantroline : étude expérimentale et théorique

Introduction : choix des ligands	127
I Synthèses et caractérisations	131
1 Synthèses.....	131
2 Caractérisations.....	133
II Impact de la variation du ligand - étude expérimentale	134
1. Mesure de l'activité des complexes	134
2. Etude de la sélectivité des complexes organométalliques.....	137
III Impact de la variation du ligand - étude théorique.....	141
Conclusion : corrélation entre la théorie et l'expérimental	146
Partie expérimentale.....	148

Chapitre 5 Système hybride

Introduction.....	149
I Résultats	151
1 Compatibilité enzyme-complexe Cp*Ir(phen)-H ₂ O	151
2 Optimisations hybrides	154
2.1 Variation de la concentration de complexe	154
2.2 Tests hybrides sans solution tampon	157
3 Catalyse hybride intégrant le complexe organométallique le plus performant	160
II Discussion	164
1 Systèmes développés	164
2 Perspectives.....	165
Conclusion	174
Partie expérimentale.....	175

Conclusion générale.....	177
--------------------------	-----

Annexe.....	179
-------------	-----

Introduction générale

La demande mondiale croissante en énergie et en produits chimiques est actuellement très majoritairement assurée par un approvisionnement en ressources fossiles, ressources par définition limitées. Pour satisfaire cette demande tout en minimisant l'impact sur l'environnement (effet néfaste des gaz à effet de serre, changement climatique, gestion des déchets), des ressources et des voies alternatives doivent être envisagées. L'intérêt pour la valorisation de la biomasse a ainsi drastiquement augmenté ces dernières décennies, tant dans le monde académique qu'industriel.¹ La valorisation des différentes composantes de la biomasse de toutes origines pour produire des molécules, des carburants et de l'énergie² a fait naître le concept de bioraffinerie. Il s'agit d'un complexe industriel intégré de nouvelle génération pouvant permettre de produire des biocarburants, des produits chimiques biosourcés, des matériaux, des produits alimentaires et de l'énergie verte (chaleur, électricité). Le monde de la pétrochimie et de la chimie fine pourra également tirer profit de la diversité fonctionnelle de la biomasse pour développer un nouveau portefeuille de molécules n'ayant pas d'équivalent fossile,³ comme par exemple l'acide furane-2,5-dicarboxylique (FDCA) en remplacement de l'acide téréphtalique (TA), par exemple, pour la synthèse de nouveaux polyesters.⁴ Ces nouvelles molécules biosourcées doivent néanmoins afficher des propriétés différentes pour pouvoir déplacer des marchés de produits bien établis et dont les spécifications sont bien connues des utilisateurs finaux. Le défi est grand mais les enjeux sociétaux afférents justifient les moyens de recherche mis en œuvre.

Il existe différents types de biomasse, celle dite de première génération (biomasse 1G) regroupe les biomasses saccharifères (betterave, canne à sucre, maïs) et oléagineuses (huile de colza, tournesol). Elles ont permis l'arrivée sur le marché notamment des premiers biocarburants : d'une part, le bioéthanol obtenu par fermentation des sucres contenus dans les plantes amylacées, et, d'autre part, le biodiesel obtenu par transestérification des triglycérides d'huiles végétales.⁵ De même, des produits chimiques de spécialité biosourcés (sorbitol et acide succinique pour ne mentionner que les plus connus dérivant de glucose 1G) ont été mis sur le marché. Les matières premières étant en compétition avec l'industrie alimentaire, des tensions en termes d'approvisionnement en biomasse

¹ Putten, R. Van *et al.* Hydroxymethylfurfural , A Versatile Platform Chemical Made from Renewable Resources. (2013). doi:10.1021/cr300182k

² Mossery, R. & Jeandel, C. *L'énergie à découvert*. (2013)

³ Gallezot, P. Conversion of biomass to selected chemical products. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1538–58 (2012)

⁴ Avantium & BASF. *Synvina: Joint venture of BASF and Avantium established*. (2016). at <<https://www.basf.com/en/company/news-and-media/news-releases/2016/10/p-16-322.html>>

⁵ Grayson, M. Biofuels. *Nat. Outlook* **474**, (2011).

et des considérations éthiques freinent aujourd'hui le développement d'une filière durable à partir de ces ressources. La biomasse lignocellulosique, dite biomasse de seconde génération (biomasse 2G), est donc envisagée comme alternative aux ressources précitées. Elle correspond aux éléments de structure d'une majorité de plantes et n'est pas directement valorisée dans l'industrie agro-alimentaire. Elle est composée des éléments suivants (Figure 1) :

- La cellulose, polymère de cellobiose organisé en microfibrilles lui donnant une structure très résistante, partiellement cristalline et perméable ;
- Les hémicelluloses, polymères de sucres C5 et C6 avec une structure ramifiée les reliant aux microfibrilles de cellulose) ;
- La lignine, polymère de motifs phénoliques, conférant à la lignocellulose une certaine rigidité, une imperméabilité et une résistante aux mécanismes de dégradation naturels.

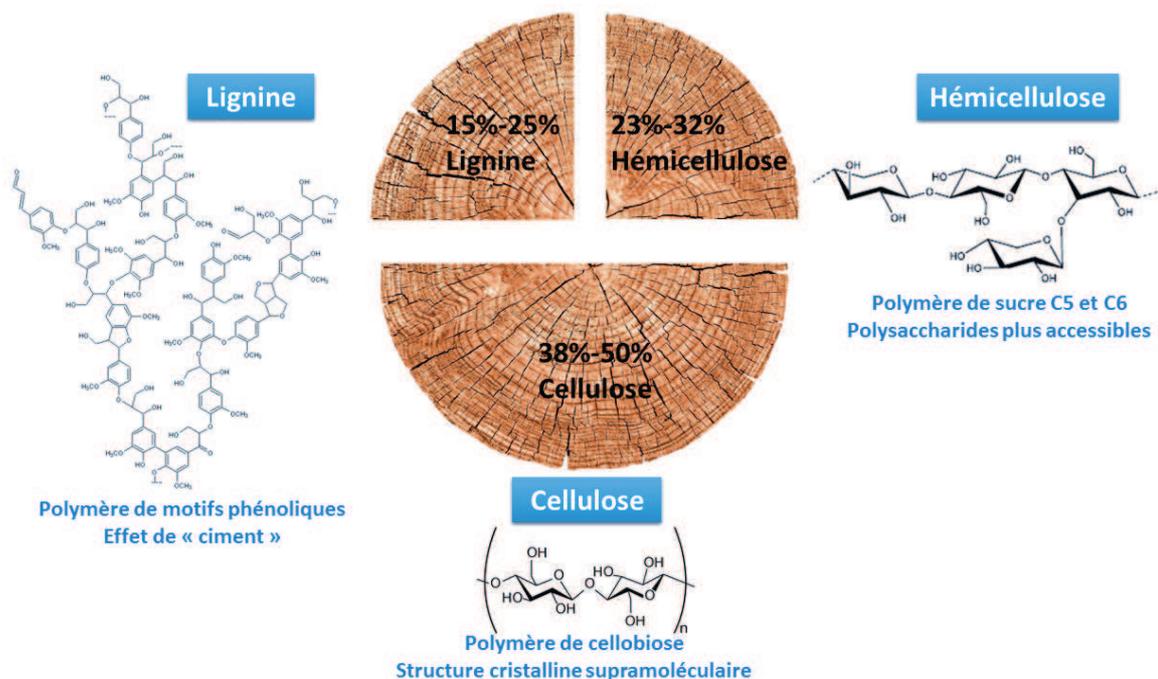


Figure 1 Composition de la biomasse lignocellulosique, dite biomasse 2G

Contrairement aux raffineries classiques, dont 80% des opérations passent par l'utilisation de catalyseurs majoritairement hétérogènes de par la nature fluide de la charge (liquide ou gaz), la mise en place de bioraffineries basées sur la valorisation de biomasses 2G devra s'appuyer sur tous les modes de catalyses existant : catalyse chimique (homogène et hétérogène) et catalyse enzymatique. Ces deux types de catalyse peuvent en effet présenter des complémentarités pour la transformation de la biomasse à différentes étapes de sa valorisation : la biocatalyse présente un avantage net de sélectivité mais le panel de substrats et de nature de réactions envisageables peut encore paraître

limité. Toutefois, les progrès récents de l'ingénierie génétique et des protéines fournissent des solutions de plus en plus sophistiquées pour améliorer l'affinité d'enzymes avec des substrats originaux, notamment non-naturels, ou pour améliorer leur stabilité vis-à-vis de solvants organiques ou de substrats initialement inhibiteurs.⁶ La catalyse chimique, qu'elle soit homogène ou hétérogène, propose quant-à-elle un spectre de transformations plus large, avec en contrepartie une sélectivité souvent plus difficile à maîtriser dans une optique de transformation de produits polyfonctionnels issus de la biomasse. Néanmoins, les avancées récentes en matière de design de catalyseurs chimiques permettent des utilisations dans des conditions plus douces, en milieux aqueux, en suivant l'essor du concept de « Chimie Verte ».⁷

Par ailleurs, la complexité fonctionnelle de la biomasse lignocellulosique impose actuellement des procédés multi-étapes pour accéder sélectivement à des cibles produits précises. Malgré des efforts d'ingénierie, la catalyse biologique est presque exclusivement opérée en phase aqueuse et tamponnée, et tolère difficilement la présence d'autres solvants organiques. C'est pourquoi il apparaît pertinent d'étudier des enchaînements réactionnels chémoenzymatiques dans l'eau.

Actuellement, les synthèses chémoenzymatiques sont principalement successives et peu intégrées. Le point commun de toutes ces synthèses intégrant des étapes de catalyse chimique et biologique développées à ce jour consiste en la nécessité d'étapes de séparations et de purifications pour limiter les inhibitions sur l'étape catalytique suivante et ainsi maintenir des conditions optimales pour chacune des catalyses. Le défi que nous nous proposons de relever dans ces travaux de thèse est d'aller au-delà en couplant de manière simultanée catalyse biologique et catalyse chimique. C'est ce concept que nous appelons « catalyse hybride » et que nous développerons dans ces travaux de thèse appliqués à la transformation de la biomasse.⁸

Le présent manuscrit de thèse est constitué de 5 chapitres suivis d'une conclusion générale. Tout d'abord, une étude bibliographique du sujet est présentée. Compte-tenu du nombre relativement faible de publications et du caractère récent du domaine, une revue la plus exhaustive possible a été réalisée. Ce chapitre bibliographique fait partie intégrante du travail de la thèse même si certains exemples sont conceptuellement assez éloignés de l'objectif final de celle-ci. Avec la connaissance de l'état de l'art dans le domaine de la catalyse hybride et des verrous associés à la valorisation de la biomasse, les pistes de recherche envisagées dans la thèse sont explicitées à la fin du chapitre bibliographique. Pour résumer, nous avons orienté l'objectif de la thèse vers la production sélective

⁶ (a) J. D. Rozzell *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2253-2261. (b) U. T. Bornscheuer, M. Pohl *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137-143. (c) M. Wang, T. Si, H. Zhao *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 117-125.

⁷ H. C. Halles *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 114-120.

⁸ Dumeignil, F. Hailing the hybrid. *Public Serv. Rev. Eur. Union* 528

de fructose à partir de sorbitol, transformation catalysée enzymatiquement par une alcool déshydrogénase. Le fonctionnement de cette enzyme est intimement lié à la présence d'un cofacteur de type nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) qu'il est vital économiquement de régénérer. Nous proposons de régénérer ce cofacteur avec un complexe organométallique n'induisant la formation d'aucun coproduit organique pour éviter toute étape de séparation superflue.

Les chapitres de résultats (2 à 5) décriront donc successivement :

- La qualification des enzymes alcool déshydrogénases mises en œuvre tout au long de la thèse et la mise au point des conditions opératoires optimales pour le meilleur compromis entre activité et stabilité ;
- La synthèse et l'étude combinée expérimentale et théorique avec un premier complexe organométallique de référence pour comprendre le mécanisme réactionnel de régénération du cofacteur ;
- La variation ciblée des propriétés électroniques du complexe de référence pour approfondir la compréhension mécanistique et optimiser les performances de régénération ;
- La mise en œuvre en catalyse hybride de l'enzyme et du complexe organométallique pour réaliser la transformation du sorbitol en fructose en maximisant la compatibilité entre les systèmes catalytiques.

Chapitre 1 Bibliographie

Introduction : Définitions

Comme nous l'avons montré dans l'introduction générale, l'intérêt croissant pour une biomasse de deuxième génération complexe structurellement rend pertinente l'étude d'enchaînements réactionnels chémoenzymatiques, de préférence en milieu aqueux. Par exemple, la production industrielle (ou en passe de le devenir) d'éthanol 2G à partir de lignocellulose est un procédé intégrant des étapes biologiques et chimiques de manière séquentielle. La biomasse lignocellulosique (paille, bagasse, résidus forestiers, etc.) subit d'abord un prétraitement chimique ou physico-chimique, comme l'explosion à la vapeur après imprégnation acide de la charge. Cette étape rend accessible la fraction cellulosique aux enzymes pour réaliser la dépolymérisation (ou saccharification) de la cellulose.¹ Cette étape d'hydrolyse enzymatique par les cellulases (Glycoside Hydrolases) ne trouve pour le moment pas d'équivalent chimique en termes de sélectivité et de rendement en sucres solubles² malgré une mise en œuvre complexe. Un procédé de fermentation prend ensuite le relais pour convertir les sucres en éthanol.

A partir de ces sucres, de nombreux produits habituellement pétrosourcés peuvent également être obtenus, soit par catalyse chimique, soit par catalyse biologique (enzymatique ou fermentaire). On peut citer le cas de l'acide succinique³ : historiquement obtenu par un procédé peu éco-efficace d'oxydation du *n*-butane puis hydrogénation/hydratation de l'anhydride maléique,⁴ il est désormais industriellement produit par fermentation de sucres de 1^{ère} génération. Ce procédé est mis en œuvre par BioAmber au Canada.⁵ Au sein de ces mini-bioraffineries BioAmber, une étape de catalyse chimique est actuellement en développement pour transformer l'acide succinique en 1,4-butanediol

¹ Lopes Ferreira, N., Margeot, A., Heiss-Blanquet, S. & Berrin, J. G. *Use of Cellulases from Trichoderma reesei in the Twenty-First Century - Part I.* (2014).

² F. Jérôme, G. Chatel, K. De Oliveira Vigier *Green Chem.* **2016**, *18*, 3903-3913.

³ van Heerden, C. D. & Nicol, W. Continuous succinic acid fermentation by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochem. Eng. J.* **73**, 5–11 (2013).

⁴ N. Ballarini, F. Cavani, C. Cortelli, S. Ligi, F. Pierelli, F. Trifiro, C. Fumagalli, G. Mazzoni, T. Monti *Top. Catal.* **2006**, *38*, 147-156

⁵ BioAmber **2012** Patent CA 2774341. Historiquement, l'acide succinique était extrait de l'ambre par distillation, ce qui a donné le nom à l'entreprise canadienne.

et tétrahydrofurane.⁶ La succession d'étapes de catalyse biologique et chimique est donc une réalité industrielle pour produire des molécules de haute valeur ajoutée.

Autre exemple important d'association chémoenzymatique issu de la littérature récente, l'éthylène glycol peut être obtenu de manière sélective à partir de biomasse⁷ ou de cellulose par combinaison de catalyse homogène et hétérogène.⁸ Cependant, cette transformation directe entraîne des rendements bien plus faibles que l'utilisation directe comme charge de glucose.⁹ Une étape d'hydrolyse enzymatique est donc indispensable avant la catalyse chimique pour atteindre de bonnes productivités en éthylène glycol à partir de biomasse lignocellulosique.

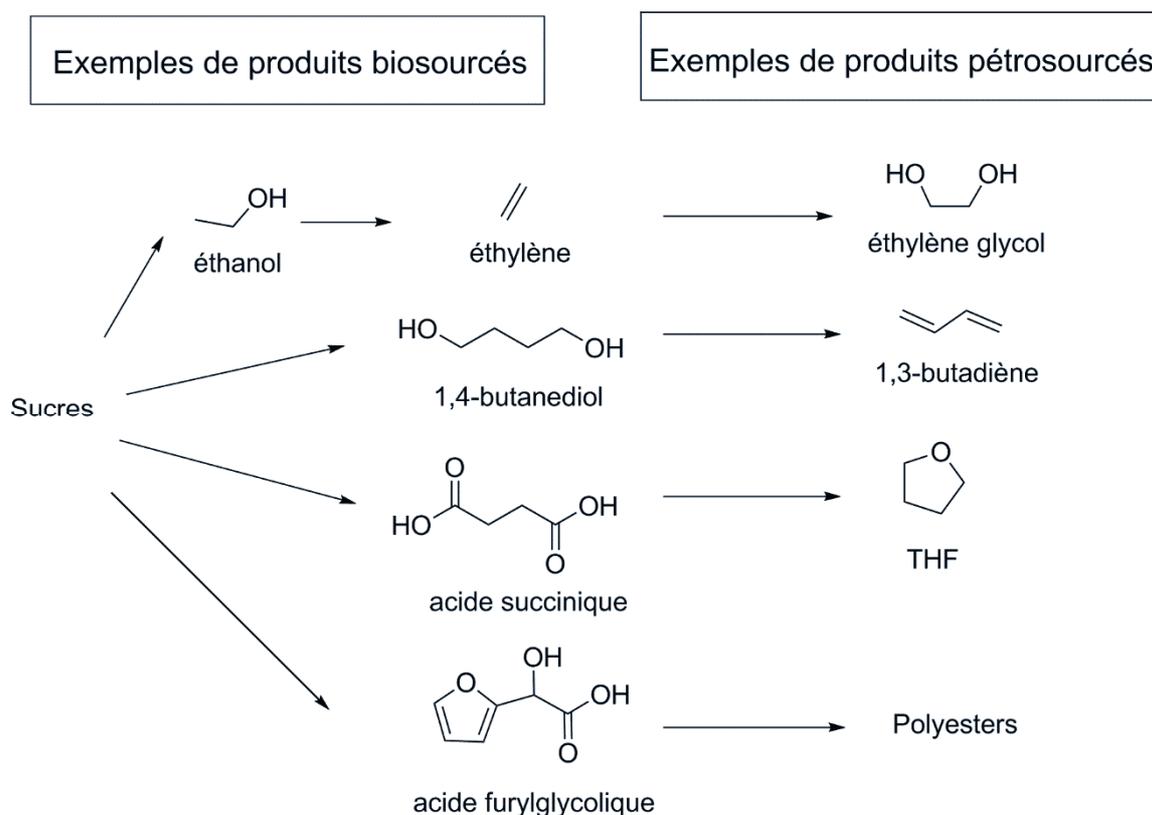


Figure 1 Arbres de produits biosourcés et pétrosourcés

Des composés difficilement accessibles à partir de ressources fossiles peuvent également être synthétisés en tirant profit d'une première étape de fermentation menant à un produit original. E. Taarning et J. Dumesic décrivent par exemple la fermentation de glucose en cortalcérone *via* la glucosone par une souche recombinante d'*Escherichia Coli*.¹⁰ Une étape de déshydratation puis

⁶ BioAmber 2011 Patent WO 2011123270

⁷ J. Pang, M. Zheng, A. Wang, T. Zhang *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50*, 6601–6608.

⁸ A. Wang, T. Zhang *Acc. Chem. Res.*, **2013**, *46*, 1377–1386.

⁹ G. Zhao, M. Zheng, J. Zhang, A. Wang, T. Zhang *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52*, 9566–9572.

¹⁰ T. J. Schwartz, S. M. Goodman, C. M. Osmundsen, E. Taarning, M. D. Mozuch, J. Gaskell, D. Cullen, P. J. Kersten, J. A. Dumesic *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2689–2693.

d'isomérisation ensuite catalysées chimiquement permettent d'accéder à l'acide furylglycolique, un nouveau monomère pour la synthèse de polyesters originaux.

On voit donc bien par ces exemples concernant la biomasse toute la richesse de produits accessibles en alternant de manière successive, mais pour le moment peu intégrées catalytiquement et énergétiquement, toutes les catalyses à disposition du chimiste : fermentation, catalyse enzymatique, catalyse hétérogène, catalyse homogène.¹¹

Le point commun de toutes ces synthèses chémoenzymatiques intégrant des étapes de catalyse chimique et biologique est la nécessité d'étapes de séparations et de purifications. Ces étapes sont nécessaires pour limiter les inhibitions sur l'étape catalytique suivante et maintenir des conditions optimales pour chacune des catalyses. Quel que soit l'ordre dans lequel les catalyses sont opérées, des inhibitions peuvent avoir lieu. Des produits non désirés issus du manque de sélectivité d'une première étape de catalyse chimique peuvent inhiber des enzymes ou des levures, comme, par exemple, des furfurals provenant du prétraitement de la biomasse avant l'hydrolyse enzymatique.¹² Inversement, des résidus peptidiques d'enzymes d'une première étape biologique peuvent inhiber l'action des catalyseurs chimiques s'ils ne sont pas éliminés.¹³

Lors de la construction de ce projet de thèse, nous étions convaincus qu'une combinaison mieux intégrée et plus synergique entre les deux mondes de la catalyse pourrait apporter des gains en termes de performance, de sélectivité et d'éco-efficience en général. L'économie du nombre d'étapes réactionnelles et de traitements intermédiaires permettrait par exemple de limiter les pertes de rendements en produits et de minimiser les quantités de solvants à mettre en œuvre ainsi que les volumes d'effluents à traiter.

Pendant la première année de thèse, les équipes de J. Hartwig et H. Gröger ont publié chacune une mini-revue allant dans le sens de la réduction du nombre de traitements et une meilleure intégration des deux mondes de la catalyse, avec de nombreuses redondances entre les deux revues.^{14,15} D'une vision classique de réactions avec traitements et isollements des produits intermédiaires, ils proposent de s'orienter vers une vision plus intégrée, en one-pot multi-étapes. La Figure 2 montre ces deux premières approches avec les deux colonnes de gauche évoquées par H. Gröger.

¹¹ B. Shanks *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 533-535.

¹² J. C. Ogier, D. Ballerini, J.-P. Leygue, L. Rigal, J. Pourquié *Oil&Gas Science and Technology*, **1999**, *54*, 67-94.

¹³ Z. Zhang, J. E. Jackson, D. J. Miller *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 5873-5880.

¹⁴ C. A. Denard, J. F. Hartwig, H. Zhao *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2856-2864.

¹⁵ H. Gröger, W. Hummel *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171-179.

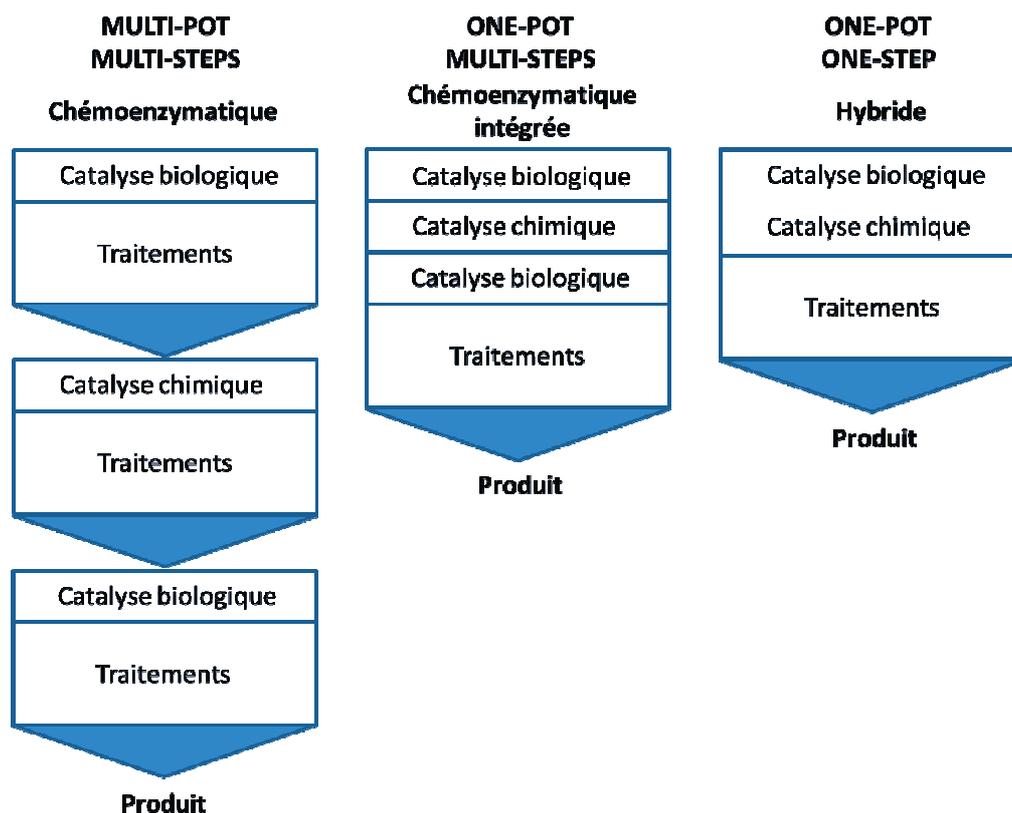


Figure 2 Différents concepts de couplages de la catalyse biologique et chimique

Le défi que nous souhaitons relever est d'aller au-delà en couplant de manière simultanée catalyse biologique et catalyse chimique en one-pot/one-step (Figure 2, colonne de droite) : concept que nous appelons « catalyse hybride ». ¹⁶ Il est assez amusant de constater qu'avant de connaître un important regain d'intérêt ces dernières années, le concept de catalyse hybride et les défis qu'il implique ont été parfaitement décrits dans l'introduction des travaux pionniers publiés en 1980 par le groupe de H. van Bekkum : ¹⁷ « L'action simultanée de la biocatalyse et de la catalyse chimique est attrayant pour de nombreux procédés catalytiques en solution. Par exemple, on peut envisager une transformation enzymatique d'un substrat en un intermédiaire qui est simultanément transformé par le catalyseur chimique en produit désiré. Les problèmes à surmonter pour ces combinaisons catalytiques sont les gammes de conditions opératoires peu étendues, la sélectivité du catalyseur chimique pour l'intermédiaire et l'inhibition mutuel des catalyseurs. ». Le décor était posé.

Ces auteurs décrivent une combinaison apparemment simple mais finement équilibrée entre une glucose isomérase immobilisée catalysant l'isomérisation glucose-fructose et un catalyseur d'hydrogénation hétérogène Pt/C pour produire le *D*-mannitol à partir du fructose. Auparavant, l'isomérisation était réalisée chimiquement mais présentait une cinétique plus lente que

¹⁶ F. Dumeignil Hailing the hybrid. *Public Serv. Rev. Eur. Union* 528

¹⁷ M. Makkee, A. P. G. Kieboom, H. van Bekkum *J.Chem.Soc. Chem. Comm.*, **1980**, 930-931.

l'hydrogénation des sucres, induisant une quantité de *D*-sorbitol importante dans le milieu obtenu par hydrogénation du glucose de départ.¹⁸ L'enzyme nécessite un minimum de salinité pour stabiliser le pH du milieu grâce à une quantité maîtrisée de MgSO₄ et CaCO₃, quantité suffisante pour ne pas inhiber le platine du catalyseur d'hydrogénation. Le catalyseur chimique a été choisi pour la sélectivité d'hydrogénation glucose/fructose en faveur du fructose et la cinétique d'hydrogénation suffisamment lente pour opérer à partir d'une concentration instantanée de fructose significative. Le ruthénium était également un métal de choix mais souffrait plus de la présence de l'enzyme. Le nickel de Raney était très fortement désactivé par l'enzyme et les catalyseurs à base d'iridium n'étaient pas suffisamment actifs.

Ces travaux représentent notamment les prémices de ce qui mènera au développement de la résolution cinétique dynamique (« DKR » pour Dynamic Kinetic Resolution) parmi les tous premiers exemples de catalyse hybride. L'objectif est l'enrichissement énantiomérique à partir d'un mélange racémique avec un travail en tandem d'un catalyseur chimique et d'une enzyme, souvent une lipase ou une protéase. Les lipases comme la CAL (*Candida Antarctica* Lipase, A ou B) sont notamment des enzymes de choix car robustes, résistantes aux solvants organiques et à des températures allant jusqu'à 100°C sans être désactivées. Les catalyseurs chimiques utilisés sont pour la grande majorité des catalyseurs organométalliques à base de palladium, rhodium, iridium, nickel, choisi en fonction de leur activité et leur compatibilité avec l'enzyme. Aucune règle générale de compatibilité ne peut être tirée des nombreux exemples et chaque combinaison doit être expérimentalement éprouvée pour trouver la meilleure synergie. La DKR a été décrite et revue à de nombreuses reprises, dont une revue récente complète du groupe de R. Leino¹⁹ et ne sera pas détaillée plus avant dans ce manuscrit.²⁰ Néanmoins, il faut noter que des évolutions récentes ont mis en œuvre des enzymes plus sensibles que les lipases et ont participé à un début d'élargissement du spectre de réactions accessibles.²¹ Depuis 2010, cette évolution reste cependant marginale mais mérite d'être suivie.

A noter qu'un procédé industriel utilisant la DKR permet aujourd'hui d'obtenir l'acétate de *1-R*-phényléthanol à hauteur de plusieurs tonnes par an. De plus, cette méthode de synthèse stéréospécifique et stéréosélective a été étendue au domaine des polymères : des polyesters ou des

¹⁸ H. C. M. Pijnenburg, B. F. M. Kuster, and H. S. van der Baan, *Starch*, **1978**, *30*, 352-355.

¹⁹ O. Langvik, T. Saloranta, D. Y. Murzin, R. Leino *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 4004-4015.

²⁰ (a) N. J. Turner *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 114-119. (b) N. J. Turner *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115-121.

²¹ R. M. Haak, F. Berthiol, T. Jerphagnon, A. J. A. Gayet, C. Tarabiono, C. P. Posterna, V. Ritleng, M. Pfeffer, D. B. Janssen, A. J. Minnaard, B. L. Feringa *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13508-13509.

polystyrènes contenant des centres asymétriques de conformations contrôlées peuvent ainsi facilement être synthétisés.²²

Avant de détailler les derniers développements du concept de catalyse hybride et exposer la stratégie de recherche choisie pour la thèse sur l'utilisation de ce concept pour la valorisation de la biomasse, voyons quels enseignements peuvent être tirés du développement récent de synthèses chémoenzymatiques intégrées.

Suite aux travaux pionniers en catalyse hybride de A. P. G. Kieboom et H. van Bekkum, ce n'est que 20 ans plus tard que T. Kieboom décrira cette fois un enchaînement chémoenzymatique²³ intégrant les trois types majeurs de catalyse dans le même réacteur. Se succèdent ainsi élégamment dans cet exemple une oxydation enzymatique du méthylgalactoside, une déshydratation organocatalysée, puis la réduction sur un catalyseur hétérogène métallique (Figure 3). Cette synthèse one-pot/multi-steps nécessite des changements d'atmosphère et de température entre les étapes.

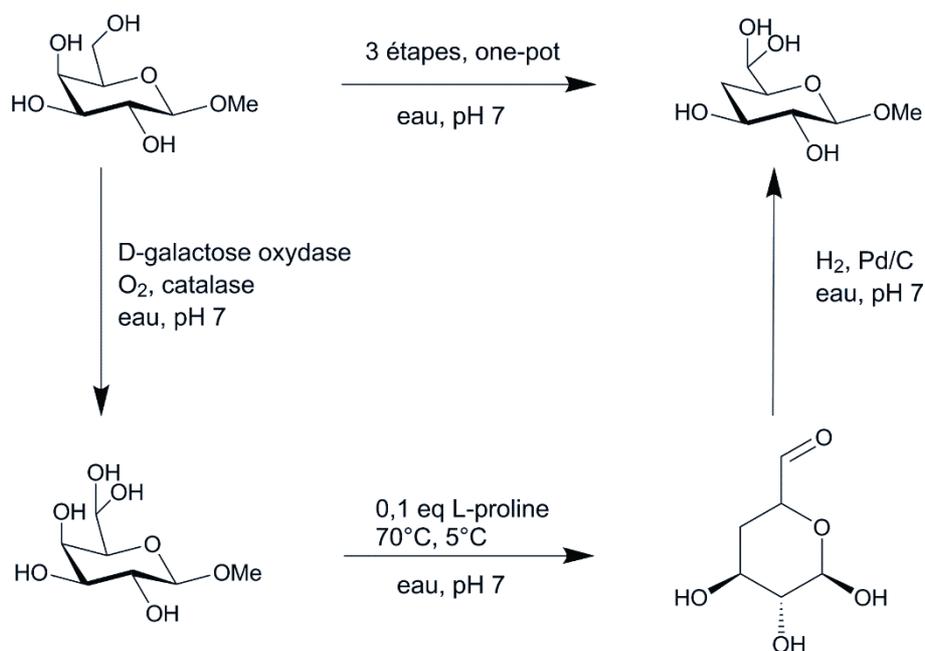


Figure 3 Exemple de réaction chémoenzymatique en cascade impliquant des catalyses enzymatiques, homogènes et hétérogènes

Quelques exemples décrivent bien les problèmes de compatibilité liés au couplage des deux catalyses et les solutions imaginées pour surmonter ces difficultés : catalyses séquentielles, immobilisation de catalyseurs sur supports, confinement ou encapsulation, membranes, milieux biphasiques, etc.

²² B. A. C. van As, J. Van Buijtenen, T. Mes, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8325–8332.

²³ R. Schoevaart, T. Kieboom, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3399–3400.

I Procédés chémoenzymatiques en one-pot : premiers pas vers la catalyse hybride

Les mini-revues de J. Hartwig et H. Gröger répertorient les premiers exemples de catalyse chémoenzymatique intégrée (deuxième colonne en Figure 2). L'intervention expérimentale entre l'étape chimique et biologique peut être un changement de température, de pH ou de salinité, l'ajout d'un co-solvant, d'un catalyseur ou d'un co-catalyseur. Les exemples énoncés dans la revue de H. Gröger et W. Hummel ne sont cependant pas focalisés sur la valorisation de la biomasse et nous ne les détaillerons pas tous mais des informations précieuses sur les problèmes de compatibilité déjà rencontrés peuvent être récoltées. La revue de J. F. Hartwig est plus orientée sur la catalyse asymétrique et les nouvelles méthodologies pour aller vers la catalyse hybride.

1. Catalyse organique et biocatalyse

Le développement de la catalyse organique ces vingt dernières années et ses progrès en termes d'énantiosélectivité et d'activité constituent un domaine intéressant pour son couplage avec la biocatalyse.²⁴ La preuve de concept a été donnée par Gröger *et coll.* en 2009 avec l'enchaînement d'une réaction d'aldolisation catalysée par un dérivé chiral de proline suivie par une réduction avec une enzyme alcool déshydrogénase.²⁵

En 2013, Kudo *et coll.* décrivent une réaction de Friedel-Crafts à l'aide d'un peptide immobilisé, polymère d'acides aminés, dans un mélange eau/THF suivie d'une α -oxyamination catalysée par une laccase. Aucun problème de compatibilité entre la laccase et le peptide n'est à mentionner, l'immobilisation défavorisant les interactions entre les catalyseurs.

Des premiers indices de compatibilité entre des enzymes et des solvants organiques apparaissent ici. Plusieurs revues sont disponibles sur le sujet remettant en cause certains préjugés qui stipuleraient que la catalyse enzymatique ne peut être opérée que dans l'eau.²⁶

Il n'est pas surprenant de rencontrer des réactions enzymatiques capables de tolérer la présence de catalyseurs organiques comme des dérivés d'acides aminés, eux-mêmes composants des enzymes.

²⁴ I. R. Shaikh *Journal of Catalysts* **2014**, *2014*, 1-35.

²⁵ K. Baer, M. Krausser, E. Burds, W. Hummel, A. Berkessel, H. Gröger *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9355-9358.

²⁶ A. P. G. Kieboom, *Biocatalysis*, Springer Science & Business Media, Chapter 17, Enzymes That Do Not Work in Organic Solvents Too Polar Substrates Give Too Tight Enzyme-Product Complexes

Le groupe de J. A. Dumesic est le premier à avoir associé une enzyme et un catalyseur hétérogène acide appliqué à la transformation du glucose en 5-HMF.

Dans le contexte de la transformation de biomasse, la valorisation des hexoses en 5-HMF occupe une place prépondérante.²⁷ Les meilleurs rendements sont obtenus à partir de fructose dans des solvants polaires aprotiques par catalyse chimique. Dans des conditions équivalentes, le glucose est moins réactif et sa déshydratation moins sélective envers le 5-HMF. Un raisonnement similaire à celui de H. van Bekkum *et coll.* en 1980 pour l'obtention du mannitol à partir d'un mélange glucose/fructose est donc possible : le fructose serait plus rapidement déshydraté que le glucose en 5-HMF et l'équilibre thermodynamique de l'isomérisation enzymatique glucose/fructose limité à 50/50 serait déplacé favorablement. Par ailleurs, l'isomérisation chimique, qu'elle soit acide ou basique, homogène ou hétérogène, n'est toujours pas au même niveau de performance que la catalyse enzymatique.²⁸ Une synthèse chémoenzymatique ou hybride mettant en jeu une glucose isomérase et un catalyseur de déshydratation paraît donc très pertinente. La conduite de chacune des réactions dans des réacteurs séparés ne permettrait en effet d'atteindre que la limite thermodynamique, à savoir environ 50% d'isomérisation par passe du glucose en fructose.

Le groupe de J. A. Dumesic est le premier à tenter l'expérience en catalyse hybride, c'est-à-dire transformer directement le glucose en 5-HMF en mélangeant le catalyseur hétérogène acide de déshydratation avec une glucose isomérase thermophile en milieu aqueux.²⁹ Cette enzyme a été développée spécifiquement pour la réaction car la déshydratation des sucres est favorisée à des températures supérieures à 100°C. Cependant, ce concept ne fonctionne pas de manière suffisamment efficace car la température n'est pas encore suffisante. De plus, la déshydratation de fructose en milieu aqueux n'est pas thermodynamiquement favorisée et le 5-HMF est très sensible à la réhydratation en acide lévulinique. Les auteurs se repositionnent donc sur une approche chémoenzymatique one-pot multi-steps avec augmentation de la température avant déshydratation et ajout d'un solvant organique pour séparer le 5-HMF produit de l'eau. Les rendements étant de l'ordre de 30% en 5-HMF, la méthode séquentielle reste toujours plus attractive. L'approche directe n'est donc pas évidente. Notons que le développement de nouvelles enzymes par génie génétique est fastidieuse et très chronophage pour un résultat potentiellement aléatoire d'amélioration de performance. Dans le contexte de la thèse démarrant sur le concept, ce type d'approche a été mis de côté d'emblée.

²⁷ R. - J. van Putten, J. C. van der Waal, E. de Jong, C. B. Rasrendra, H. J. Heeres, J. G. de Vries *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1499-1597.

²⁸ I. Delidovich, R. Palkovits *ChemSusChem* **2016**, *9*, 547-561.

²⁹ H. Huang, C. A. Denard, R. Alamillo, A. J. Crisci, Y. Miao, J. A. Dumesic, S. L. Scott, H. Zhao *ACS Catal.* **2014**, *4*, 2165-2168.

Dans les travaux de l'équipe de Dumesic, la présence de glucose résiduel ne semble pas souhaitable car sa réactivité avec le catalyseur de déshydratation n'est pas nulle et mène à des produits secondaires indésirables, comme les humines. Une séparation sélective du glucose et du fructose paraît donc indispensable. Pour limiter les coûts de séparation et le nombre d'étapes en approche chémoenzymatique, une autre méthodologie a été regardée dès 2010. Elle consiste à déplacer chimiquement l'équilibre d'isomérisation glucose/fructose en utilisant une méthode de fonctionnalisation ou de protection sélective du fructose.

Une autre voie chémoenzymatique d'accès au 5-HMF consiste donc à travailler en milieu biphasique en présence de complexants comme des dérivés aluminés ou borés.³⁰ Ces derniers sont choisis pour leur affinité préférentielle avec le fructose par rapport au glucose pour deux raisons : déplacer l'équilibre d'isomérisation vers le fructose et transférer le complexe de fructose ou le 5-HMF produit vers la phase organique. Le premier exemple de complexation a été décrit dans les années 1970 en présence de tétraborate de sodium et permet ainsi de déplacer l'équilibre d'isomérisation enzymatique vers le fructose : un rendement global en fructose et complexe fructoborate de 88% est obtenu au lieu des 50% habituels.³¹ Cette méthode a été exploitée pour le premier couplage isomérisation enzymatique/déshydratation chimique décrit en 2010 par Qi *et coll.*³² La déshydratation est cependant réalisée dans la phase aqueuse et c'est le 5-HMF qui est transféré vers une phase organique 1-butanol. Basé sur les travaux de Draffin *et coll.*³³ montrant que des acides arylboroniques lipophiles pouvaient complexer et transporter le fructose à travers une interface eau/solvant organique, le concept d'isomérisation/déshydratation a été améliorée en réalisant l'isomérisation enzymatique en phase aqueuse. Le fructose est ensuite sélectivement complexé avec l'acide boronique, l'ester boronique est transporté vers la phase organique et le fructose est finalement décomplexé/déshydraté en 5-HMF en phase organique à l'aide d'un unique catalyseur acide.

Cette voie est actuellement explorée dans une thèse co-promue par l'UCCS, IFPEN et l'Institut Charles Violette dans le cadre des travaux d'Alexandra Gimbernat (Figure 4).

³⁰ A. J. Shaw, G. T. Tsao *Carbohydr. Res.* **1978**, *60*, 376–382.

³¹ (a) R. Van den Berg, J. A. Peters, H. Van Bekkum *Carbohydr. Res.* **1994**, *253*, 1; (b) S. Chapelle, J. F. Verchere, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 4469–4482; (c) J. F. Verchere, M. Hlaibi *Polyhedron*, **1987**, *6*, 1415–1420.

³² R. Huang, W. Qi, R. Su, Z. He *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1115–1117.

³³ (a) S. P. Draffin, P. J. Duggan, S. A. Duggan *Org. Lett.* **2001**, *3*, 917-920. (b) S. P. Draffin, P. J. Duggan, S. A. Duggan, J. C. Norrild *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9075-9082.

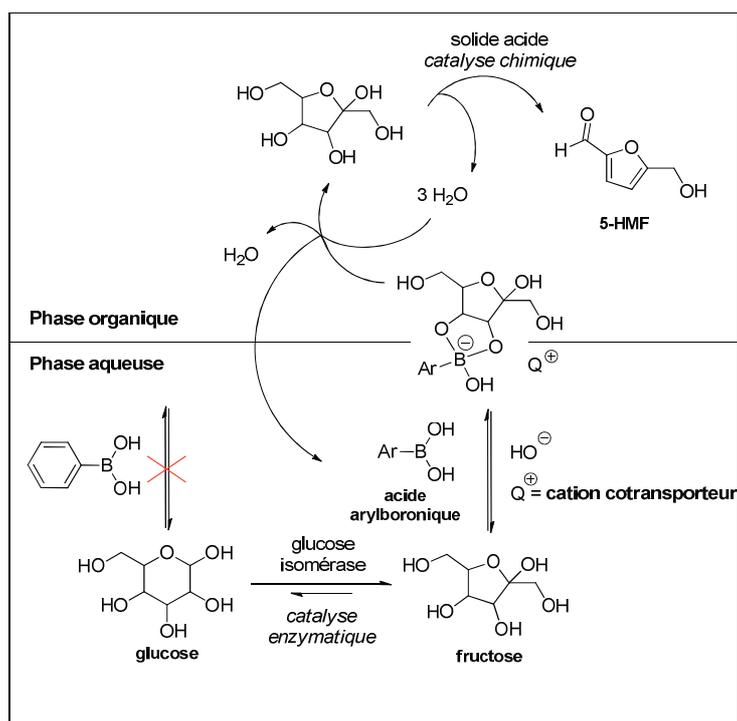


Figure 4 Concept d'isomérisation/déshydratation en milieu biphasique en présence d'acide boronique et de transporteur

Une autre voie avec extraction a également été décrite très récemment par S. Alipour. L'enchaînement est complexe car il ajoute une étape de relargage du complexe fructose/acide boronique dans un liquide ionique avant l'étape de déshydratation et extraction du 5-HMF vers un solvant organique. Le rendement obtenu à partir de glucose est de 80% (Figure 5).³⁴

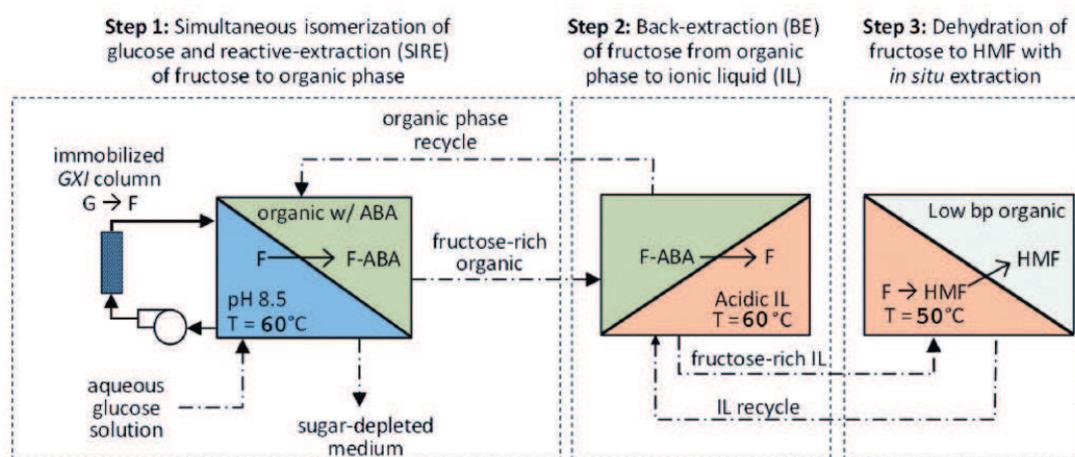


Figure 5 Schéma de synthèse chémoenzymatique du 5-HMF à partir du glucose avec double transport du complexe fructose-transporteur, schéma extrait de la référence 34.

³⁴ S. Alipour *Green Chem.* **2016**, *18*, 4990-4998.

Compte-tenu de publications récentes, il semble que le groupe de R. Palkovits s'intéresse également à cette méthodologie.³⁵ Pour le moment, l'isomérisation n'est pas catalysée enzymatiquement mais par un tampon phosphate $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$. Un criblage d'acides boroniques montre le meilleur résultat avec le HMPBA présenté Figure 6.

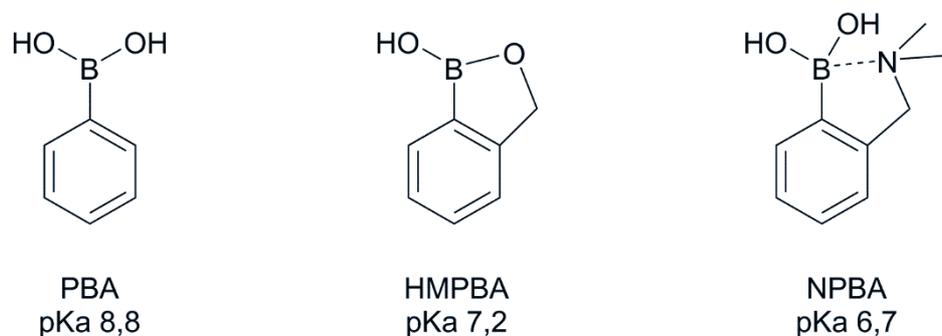


Figure 6 Acides boroniques envisagés par R. Palkovits et *coll.* pour complexer sélectivement le fructose

Par ailleurs, une proposition de réactions en cascade exploitant un même support poreux différemment fonctionnalisé pour le catalyseur enzymatique de saccharification de la cellulose en glucose, d'isomérisation de glucose en fructose et de déshydratation de fructose en 5-HMF en solvant organique a été proposée par Wu *et coll.*³⁶ Bien que la méthode apparaisse élégante, le rendement final obtenu par cette voie n'excède pas 40%.

Il apparaît de tous ces travaux que la transformation chémoenzymatique de glucose en 5-HMF, réel défi dans le monde de la valorisation de la biomasse, n'est pas évidente. Elle nécessite des astuces « procédé » pour minimiser le nombre d'étapes tout en maximisant le rendement : milieux biphasiques, membranes, transporteurs, complexants, extractions, relargages, etc. Ils sont toutefois riches d'enseignements sur les compatibilités entre la glucose isomérase et les catalyseurs de déshydratation, les complexants, les transporteurs et les solvants organiques.

2. Catalyse organométallique et biocatalyse

Il est intéressant de constater que dans la dernière décennie, des synthèses chémoenzymatiques impliquant des catalyseurs organométalliques composés d'un métal et d'un ligand organique ont suscité un grand intérêt. Il serait naturel de s'attendre à des réactions catalysées par des complexes métalliques dérivés de métaux biocompatibles fréquemment rencontrés dans les enzymes ou métalloenzymes comme le zinc, le cuivre, le fer ou le calcium. De manière surprenante, les premiers travaux dans le domaine se sont développés autour de métaux classiques de la chimie organique

³⁵ I. Delidovich, R. Palkovits *Green Chem.* **2016**, *18*, 5822-5830.

³⁶ Y.-C. Lee, S. Dutta, K. C.-W. Wu *ChemSusChem* **2014**, *7*, 3241-3246.

comme le palladium, le rhodium ou le ruthénium. Des exemples de synthèses chémoenzymatiques impliquant des métalloenzymes et des métaux biocompatibles n'ont été décrites que plus récemment.³⁷

Le tout premier exemple décrit en 2006 mettant en jeu des catalyseurs organométalliques consiste en une étape d'hydrogénation chimique en phase aqueuse de *N*-acétylaminoacrylate catalysée par un complexe de rhodium suivi d'une hydrolyse enzymatique énantiospécifique par une acylase (CLEA AM) après ajustement de la température, du pH et ajout d'une solution tampon. Pour réaliser la réaction en catalyse hybride one-pot, le complexe de rhodium doit être immobilisé sur un support silicique poreux (1-AITUD-1) mais le système mène à des performances moins intéressantes.³⁸ Les deux étapes sont effectuées en phase aqueuse (Figure 7).

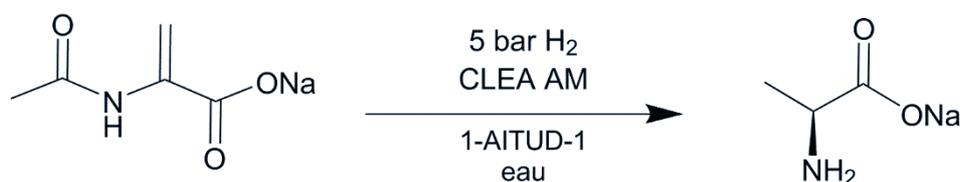


Figure 7 Première synthèse chémoenzymatique impliquant un complexe organométallique

Un autre exemple du groupe de Marko Mihovilovic³⁹ montre que des enzymes du type Bayer-Villiger monooxygénases sont actives pour transformer des cyclopentanones substituées, en présence du solvant organique issu de l'étape d'hydrogénation chimique hétérogène de la cyclopenténone correspondante (Rh/C), opérée en continu. L'utilisation d'un adjuvant de type Triton X-100 reste souhaitable pour faciliter le transfert des composés entre les deux phases mais, de manière surprenante, les performances sont satisfaisantes malgré la présence de solvant organique, certes non-miscible à l'eau (Figure 8).

³⁷ (a) T. K. Hyster, L. Knörr, T. R. Ward, T. Rovis *Science* **2012**, *338*, 500-503. (b) T. R. Ward *Acc. Chem. Res.* **2010**, *44*, 47-57.

³⁸ C. Simons, U. Hanefeld, I. W. C. E. Arends, T. Maschmeyer, R. A. Sheldon *Top. Catal.* **2006**, *40*, 35-44.

³⁹ M. J. Fink, M. Schön, F. Rudroff, M. Schnürch, M. D. Mihovilovic *ChemCatChem* **2013**, *5*, 724-727.

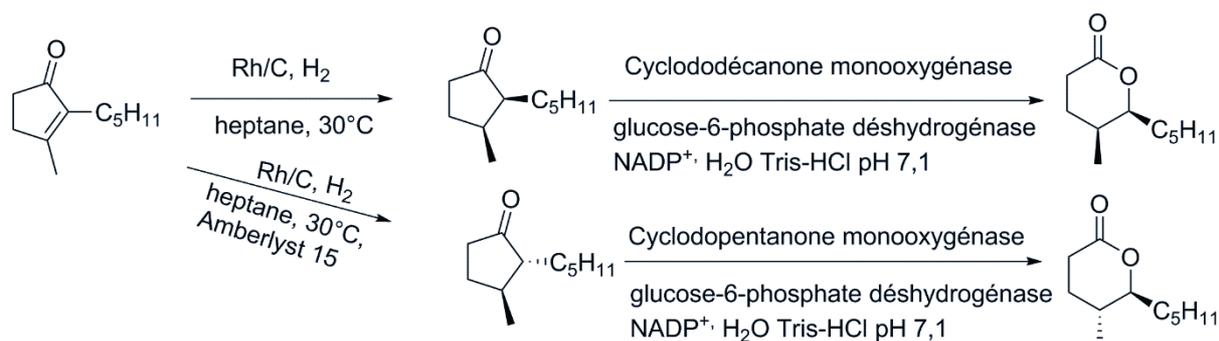


Figure 8 Synthèse chémoenzymatique de lactones chirales par succession de catalyse métallique et enzymatique

D'autres enchaînements de catalyses organométalliques suivis d'une catalyse enzymatique ou en cellule entière ont été décrits dans la dernière décennie. Par exemple, H. Gröger et W. Hummel rapportent le couplage de Suzuki entre l'acide phénylboronique et l'acétophénone bromée suivie de la réduction énantiosélective de la cétone par une enzyme de type alcool déshydrogénase sans purification intermédiaire (Figure 9a).⁴⁰ Un ajustement de pH et l'ajout d'*isopropanol* ont été nécessaires pour garantir l'activité de l'enzyme. Leur objectif initial était de travailler en catalyse hybride mais l'acide boronique s'est avéré un inhibiteur fort de l'enzyme. Il doit donc être totalement converti avant d'ajouter le catalyseur enzymatique. Un travail important de recherche d'inhibition croisée doit donc être rigoureusement mené avant de coupler les deux mondes de la catalyse.

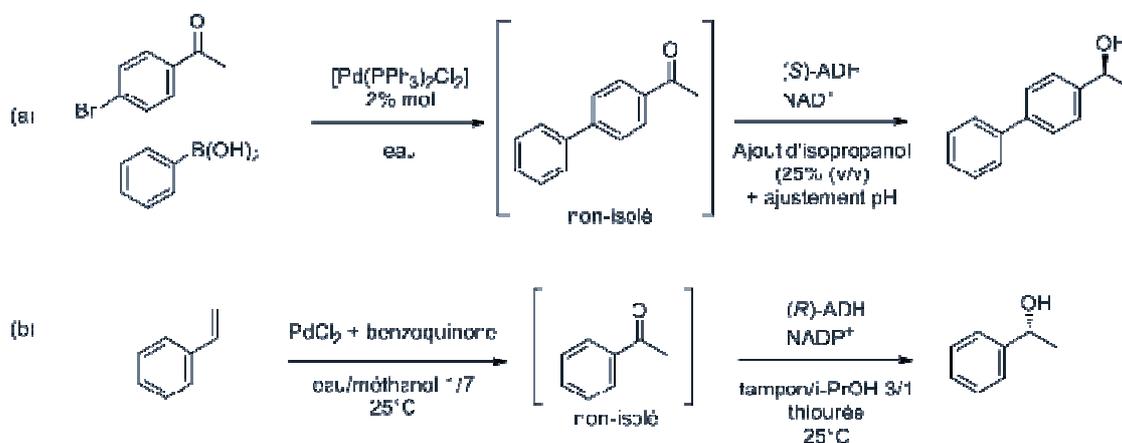


Figure 9 Synthèses chémoenzymatiques successives sans isolement du produit organique intermédiaire

Des exemples similaires d'hydrogénation enzymatiques de cétophénones ont été menés après des étapes catalysées par des complexes de palladium sans isolement du produit intermédiaire avec des couplages de Heck⁴¹ ou des oxydations de Wacker (Figure 9b).⁴² Dans les deux cas, un ajustement de

⁴⁰ E. Burda, W. Hummel, H. Gröger *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9551-9554.

⁴¹ A. Boffi, S. Cacchi, P. Ceci, R. Cirilli, G. Fabrizi, A. Prastaro, S. Niembro, A. Shafir, A. Vallribera *ChemCatChem* **2011**, *3*, 347-353.

pH est indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme alcool déshydrogénase. En catalyse chimique, organométallique, une autre grande réaction a été couplée à la catalyse biologique : la métathèse des oléfines. Le premier cas en one-pot two-steps décrit une première étape de fermeture de cycle (RCM) d'un bis-allylmalonate par un complexe de ruthénium et la deuxième étape est une monohydrolyse en monoester par une esterase de foie de porc (Figure 10). Intermédiairement, la salinité a été ajustée et un co-solvant ajouté. L'activité enzymatique n'est pas perturbée par la présence du complexe de ruthénium. Les deux étapes sont menées de façon successive.

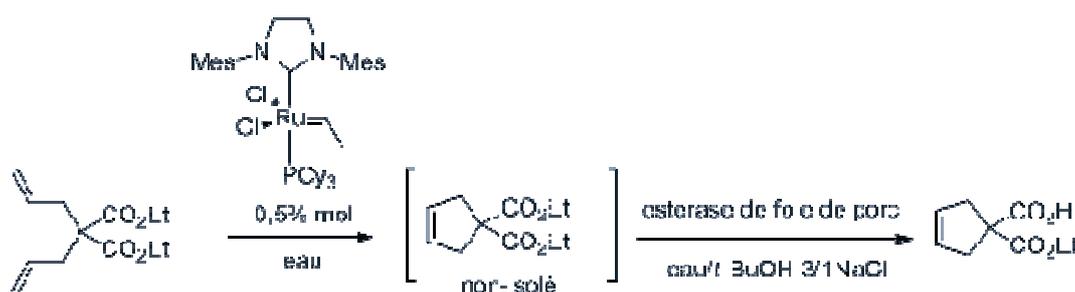


Figure 10 Premier exemple de métathèse dans une synthèse chémoenzymatique

Un exemple plus récent impliquant la métathèse montre encore mieux le potentiel de synthèse chémoenzymatique, à la frontière entre l'intégration chémoenzymatique et la catalyse hybride. Les réactions sont menées dans un milieu biphasique avec une réelle synergie entre les deux étapes. Hartwig et coll. décrivent la production d'époxydes à partir d'oléfines ou d'acides gras comme le montre la Figure 10.⁴³ Les catalyseurs utilisés sont un catalyseur de Grubbs de deuxième génération connu pour son activité pour la métathèse et le cytochrome P450 de la bactérie *Bacillus megaterium* (BM3) qui permet d'effectuer l'époxydation sélective d'un acide gras insaturé, et d'un seul, parmi un mélange. L'équipe a porté une attention particulière à propos de la compatibilité des deux catalyses. Le catalyseur de métathèse a été sélectionné pour sa stabilité à l'air et son activité dans les solvants protiques. La réaction a lieu en milieu biphasique *isooctane*/eau, organique pour la métathèse et aqueuse pour l'époxydation car le catalyseur de Grubbs est sensible au milieu oxygéné. L'*isooctane* est approprié pour la métathèse et est également biocompatible avec le cytochrome P450.

⁴² I. Schnapperelle, W. Hummel, H. Gröger *Chem.-Eur. J.* **2012**, *18*, 1073-1076.

⁴³ C. Denard, H. Huang, M. Bartlett, L. Lu, T. Yichen, Z. Huimin, J. F. Hartwig, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 465-469.

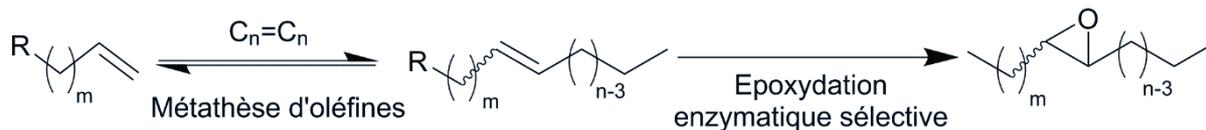


Figure 11 Exemple d'utilisation de la catalyse hybride selon Hartwig et *coll.* pour la métathèse et l'époxydation d'acide gras insaturés. Il existe ici une réelle synergie car le produit ne peut pas être obtenu avec un rendement aussi haut si les deux étapes sont réalisées de manière successive, l'oxydation régiospécifique permettant de déplacer favorablement l'équilibre thermodynamique de la métathèse sur un unique produit.

De nombreuses réactions chémoenzymatiques ont donc été développées ces dernières années avec un souci croissant d'intégration pour minimiser le nombre d'étapes et maximiser les performances. Bien souvent, les incompatibilités entre les catalyseurs ou les conditions dans lesquelles ils possèdent une activité optimale empêchent une réelle mise en œuvre tandem avec cohabitation. Des solutions procédés innovantes ont donc été imaginées pour néanmoins optimiser la productivité des systèmes. Les travaux les plus récents s'orientent fortement vers la transformation de molécules biosourcées, substrats de choix de par leur diversité fonctionnelle et leur complexité de transformation impliquant une succession de catalyses isolées. L'objectif initial de la thèse était de développer un nouveau système de catalyse hybride pour la transformation de molécules biosourcées, détaillons les exemples décrits jusqu'à présent.

3. Catalyse hybride

3.1. Concept

Un des grands défis de la catalyse hybride réside donc dans la compatibilité de tous les substrats avec tous les catalyseurs, et dans la mise en œuvre de toutes les réactions dans des fourchettes identiques de pH, de température, d'atmosphère, de solvant et de cinétiques. Les conditions optimales de fonctionnement des deux catalyses peuvent en effet parfois être assez différentes. Par exemple, la Figure 12 montre de manière globale les fourchettes de travail de la biocatalyse et de la catalyse chimique. Une large gamme de températures est commune aux deux mondes, mais la température de travail en catalyse hybride sera dictée par les catalyseurs les plus thermosensibles que sont les catalyseurs du vivant : enzymes, champignons, levures ou bactéries ayant une activité optimale entre la température ambiante et une centaine de degrés pour les biocatalyseurs les plus thermophiles.⁴⁴ Dans cette fourchette de travail, de nombreux catalyseurs chimiques, notamment en catalyse homogène, présentent également leur optimum d'activité.

⁴⁴ L.D. Unsworth, J. Van Der Oost, S. Koutsopoulos, *FEBS J.* **2007**, 274, 4044–4056.

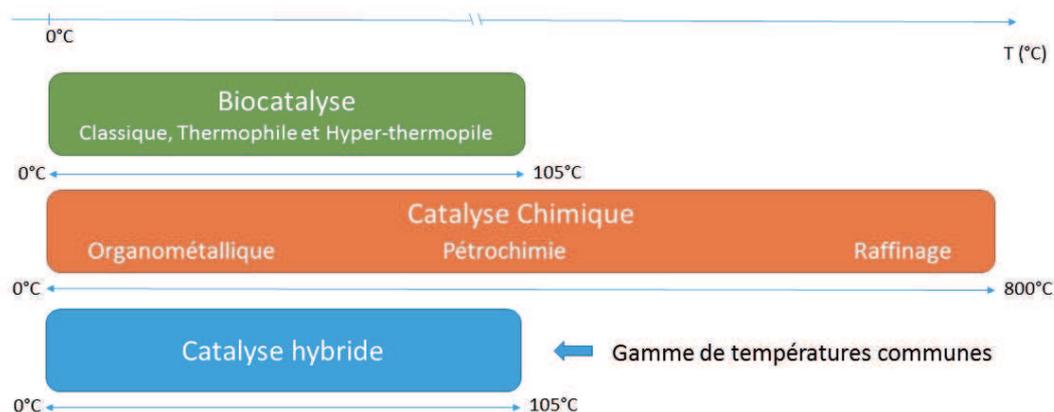


Figure 12 Gamme de températures communes pour la catalyse hybride

Le grand défi consiste donc en l'exploitation rationalisée des avantages de chacune des catalyses pour permettre d'accéder à des transformations nouvelles, non réalisables par chacune des catalyses prises indépendamment - ou alors avec des rendements plus faibles. L'objectif est donc de rechercher un effet synergique et/ou complémentaires entre les réactions. Cet effet réside dans le fonctionnement tout à fait simultané du biocatalyseur et du catalyseur chimique (qu'il soit homogène ou hétérogène) : cette association entre les deux catalyses a été, comme susmentionné, nommée « catalyse hybride » et requiert une totale compatibilité réactionnelle : cinétique, solvant, température, impuretés, etc. Dans ce développement de la catalyse hybride, outre les cas nombreux de résolution cinétique dynamique, les exemples sont rares.

Une condition nécessaire pour qu'un procédé impliquant deux catalyses fonctionnant en tandem dans un seul et même réacteur soit performant (appelée par J. Hartwig « One-Pot Concurrent Systems ») est la compatibilité de chaque réaction entre elles. Nous avons vu dans le paragraphe précédent que l'isolement des catalyseurs grâce à la mise en œuvre en milieux biphasiques ou l'utilisation de membranes pouvait permettre aux deux catalyses d'opérer simultanément. Pour aller vers un caractère hybride, d'autres méthodes, pour la plupart astucieuses, ont été rapportées.

3.2. Exemples de catalyse hybride

Le groupe de Turner, déjà bien présent dans le domaine de la DKR, propose d'utiliser des cellules entières pour isoler les biocatalyseurs enzymatiques contenus dans cette cellule. Cette méthodologie a été appliquée dans le cas de la déracémisation d'une amine secondaire cyclique, difficile à réaliser par DKR contrairement aux amines primaires. Ils combinent des cellules d'*E. Coli* surexprimant une monoamine oxydase sur la surface desquelles sont déposées des nanoparticules de palladium comme catalyseur d'hydrogénation non sélectif (Figure 13). L'enzyme n'oxyde que l'amine secondaire de stéréochimie *S* du mélange racémique initiale de 1-méthyltetrahydroisoquinoline alors

que le catalyseur d'hydrogénation fournit en retour un mélange équimolaire *R* et *S*. Le milieu s'enrichit donc progressivement en énantiomère *R* non oxydé par l'enzyme. Des cycles air/hydrogène sont toutefois nécessaires pour faire fonctionner alternativement l'enzyme oxydase et le catalyseur Pd-NP. Les deux catalyseurs sont donc compatibles grâce à la séquestration de l'enzyme dans la cellule entière qui la produit, mais les catalyses opèrent alternativement.

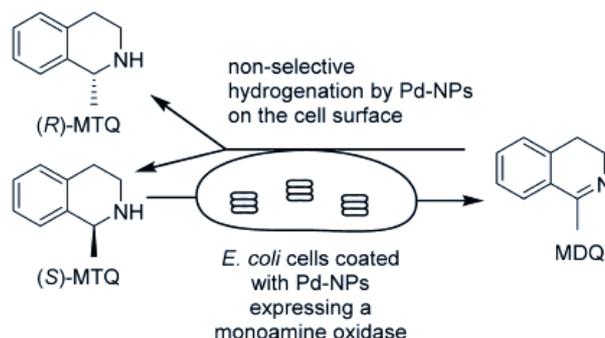


Figure 13 Déracémisation d'une amine chirale imaginée par Turner *et coll.*

L'utilisation de microorganismes (bactéries, levures) ou cellules entières montre souvent plus d'inconvénients que d'avantages à cause des nutriments nécessaires constituant une autre source de contamination.⁴⁵ Dans la littérature, la catalyse hybride, de la même façon que les synthèses chémoenzymatiques décrites plus haut, est donc majoritairement orientée vers l'utilisation de catalyseurs enzymatiques pour la composante biocatalytique.

Une alternative très ambitieuse consiste donc à ne mettre en œuvre qu'un unique « catalyseur » comportant plusieurs fonctions catalytiques orthogonales. Palomo *et coll.* se sont attaqués à ce défi en développant des catalyseurs « nanobiohybrides » synthétisés comme des assemblages d'enzymes et de nanoparticules.⁴⁶ Outre une activité intéressante en couplages C-C palladocatalysés (Suzuki, Heck), des réactions de DKR ont été réalisées avec des catalyseurs CALB-PdNPs avec transestérification enzymatique et racémisation métallique (Figure 14).

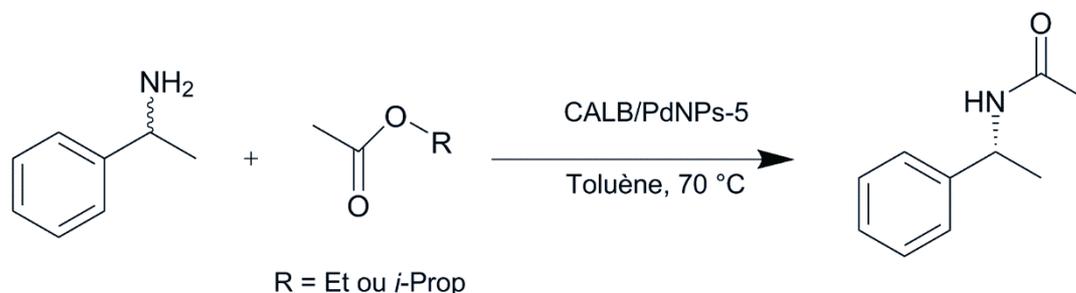


Figure 14 DKR d'une amine racémique en amide énantiopure catalysée par un nanobiohybride

⁴⁵ T. J. Schwartz, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 12718–12722

⁴⁶ M. Filice, M. Marciello, M. d. P. Morales, J. M. Palomo *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 6876-6878.

Incorporer des catalyseurs métalliques dans les protéines est un important axe de recherche pour la synthèse de métalloenzymes artificielles. L'incorporation d'un complexe d'iridium biotinylé au sein de la streptavidine a permis de le biocompatibiliser vis-à-vis d'autres enzymes contrairement à son utilisation comme complexe libre dans le milieu. Son couplage avec des mono-oxydases ou mono-oxygénases génère des systèmes hybrides originaux actifs et sélectifs pour diverses transformations décrites dans l'article (Figure 15).⁴⁷

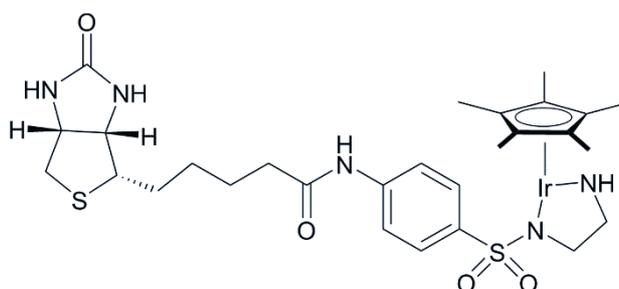


Figure 15 Complexe d'iridium biotinylé pour application en catalyse hybride

Avec une approche de chimie supramoléculaire, le groupe de D. Toste a décrit l'encapsulation de complexes d'Au(I) et de Ru(II) dans des clusters tétraédriques de Ga_4L_6 pour les combiner avec des estérases, lipases et alcool déshydrogénases, élargissant le panel de transformations possibles au-delà des DKR et autres méthodes de déracémisation.⁴⁸ Les rendements obtenus en catalyse hybride sont identiques à ceux obtenus par étape successive avec l'économie de l'étape intermédiaire de purification.

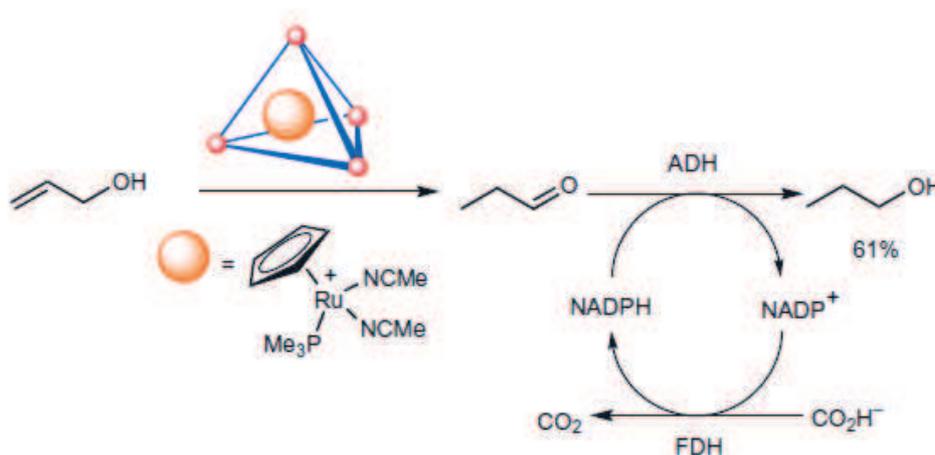


Figure 16 Encapsulation d'un complexe de ruthénium pour compatibilisation avec une alcool déshydrogénase

⁴⁷ V. Köhler, Y. M. Wilson, M. Dürrenberger, D. Gishlieri, E. Churakova, T. Quinto, L. Knörr, D. Häussinger, F. Hollmann, N. J. Turner, T. R. Ward *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 93-99.

⁴⁸ Z. J. Wang, K. N. Clary, R. G. Bergman, K. N. Raymond, F. D. Toste *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 100-103.

Très rarement, cette séquestration n'est pas nécessaire et l'exemple sans doute le plus spectaculaire à ce jour selon nous mettant en avant la combinaison d'un catalyseur organométallique et une enzyme provient du groupe de Wolfgang Kroutil en 2010.⁴⁹ Dans cet article, pas moins de 7 produits organiques (substrats/produits), deux enzymes et un complexe d'iridium cohabitent dans un milieu eau/toluène tamponné, pour un exemple des plus élégants de déracémisation. Un mélange racémique de chlorohydrines est oxydé en chlorocétone par un complexe iridacyclique. Une autre chlorocétone encombrée est utilisée comme agent de transfert d'hydrogène. La chlorocétone produite est ensuite sélectivement réduite par l'alcool déshydrogénase fonctionnant avec un cofacteur NADH. La régénération de NADH est assurée par une formiate déshydrogénase. Le donneur d'hydrogène chlorocétone encombré est choisi pour ne pas être réduit par l'alcool déshydrogénase et chaque système catalytique œuvre donc de manière parfaitement orthogonale sans interagir sur les substrats d'un autre système catalytique.

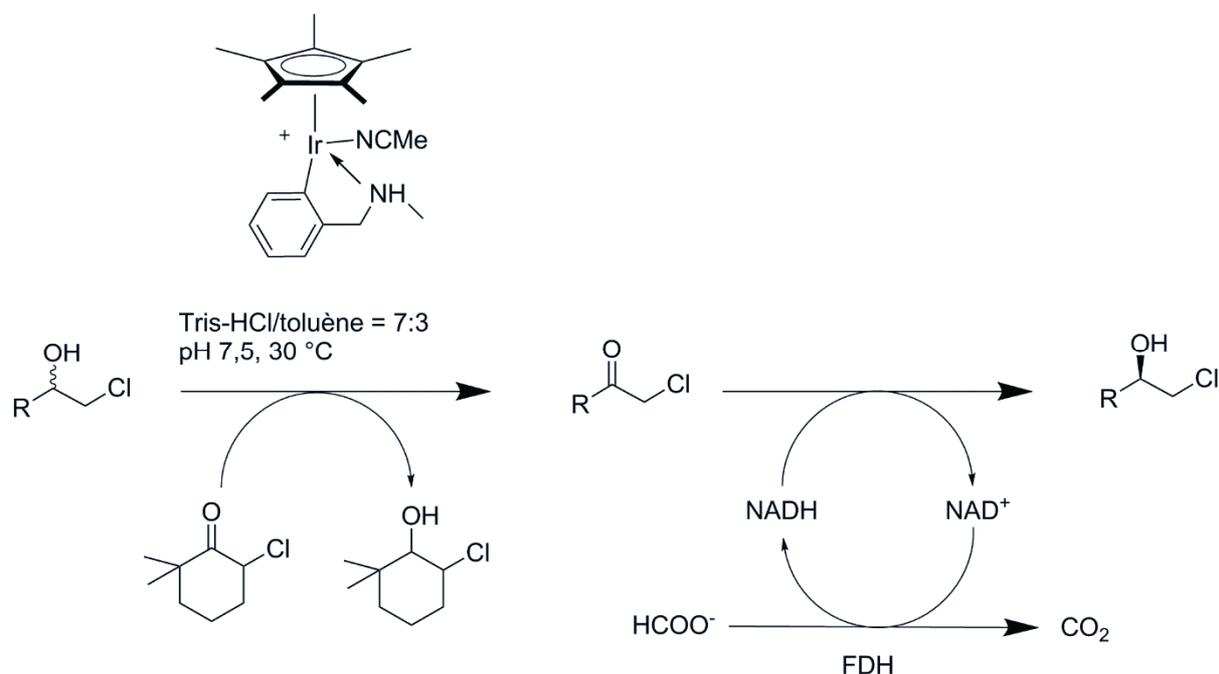


Figure 17 Système complexe multi-composants de catalyse hybride pour la racémisation d'halohydrines

Contrairement à une mise en œuvre successive, le travail en catalyse hybride nécessite donc d'imaginer des astuces expérimentales et méthodologiques afin de limiter les interactions croisées entre les systèmes catalytiques, en plus de la compatibilité de conditions réactionnelles. Tous ces exemples nous montrent bien l'intérêt croissant pour le couplage des deux mondes de la catalyse et des domaines entiers de recherche ont vu le jour nécessitant de coupler les compétences en catalyse enzymatique et catalyse chimique.

⁴⁹ (b) F. G. Mutti, A. Orthaber, J. H. Schrittwieser, J. G. de Vries, R. Pietschnig, W. Kroutil *Chem. Commun*, **2010**, 46, 8046-8048.

II Catalyse hybride, ou comment lever les verrous de la catalyse enzymatique avec la catalyse chimique

Nous observons qu'une large majorité des exemples des réactions catalysées par des enzymes implique des enzymes oxydases ou oxydoréductases, parmi lesquelles les alcool déshydrogénases occupent une place importante. Il est rarement mentionné dans les publications que les mécanismes de fonctionnement de ces familles d'enzymes engagent systématiquement une seconde enzyme, ce qui induit deux verrous majeurs à la mise en œuvre de la catalyse enzymatique à plus grande échelle :

- Dans le cas des oxydases, comme la glucose oxydase, les aminoacides-oxydases ou les laccases, l'oxydant utilisé par l'enzyme est l'oxygène qui le transforme en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier étant toxique pour l'enzyme, l'utilisation d'une catalase est obligatoire pour retransformer l'eau oxygénée en eau et en oxygène ;
- Dans le cas des alcools déshydrogénases, qu'elles soient utilisées dans le sens de la déshydrogénation ou de l'hydrogénation (la majorité des exemples de synthèse chémoenzymatiques mettent en jeu une hydrogénation énantiosélective), ces enzymes sont dépendantes de cofacteurs de type NAD(H) ou NADP(H), qui doivent être régénérés par un second système enzymatique redox. L'utilisation d'un cofacteur coûteux qu'il faut régénérer empêche souvent le déploiement de cette famille d'enzymes dans des procédés à grande échelle.

Les synthèses chémoenzymatiques et hybrides mettent à jour les deux verrous importants des deux grandes classes d'enzymes propices à la valorisation de la biomasse. Ces verrous constituent des freins au développement à plus grande échelle par le coût associé de systèmes enzymatiques parallèles respectivement à base de catalase et d'enzymes de régénération de cofacteurs. Ces systèmes couplés nécessitent de plus des substrats et co-substrats qui peuvent poser des contraintes supplémentaires lors de la séparation des produits d'intérêt et le recyclage des catalyseurs.

Nous avons donc choisi d'orienter notre approche de la catalyse hybride afin de lever ces verrous : comment la catalyse chimique pourrait-elle se substituer aux systèmes couplés de catalyse enzymatique pour simplifier les systèmes et les rendre plus éco-efficients ? A la lueur de tous les travaux précédemment décrits en synthèse chémoenzymatique et catalyse hybride, nous allons décrire séparément les deux grandes voies d'études que sont la transformation catalytique *in situ* de l'eau oxygénée et la régénération de cofacteurs de type NAD/NADH pour en tirer le domaine d'études de plus grand intérêt fondamental et appliqué pour ces travaux de thèse.

1. Transformation catalytique *in situ* de l'eau oxygénée

Les enzymes oxydases sont une sous-classe des enzymes oxydoréductases qui catalysent des réactions d'oxydations en utilisant le dioxygène comme accepteur d'électrons, comme l'illustre la Figure 18.⁵⁰



Figure 18 Schéma réactionnel général catalysé par une enzyme oxydase

Ces enzymes opèrent sans cofacteur mais libèrent du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier peut être délétère à partir de faibles concentrations pour l'activité enzymatique. En cellule entière, des enzymes de la famille des catalases dégradent cette eau oxygénée pour maintenir une activité enzymatique cellulaire satisfaisante. *A contrario*, l'utilisation synthétique d'enzymes oxydases isolées impose un système enzymatique complémentaire qui peut induire un coût supplémentaire non négligeable pour le procédé. À la place d'une catalase, il pourrait donc être intéressant d'utiliser un catalyseur chimique d'oxydation permettant de générer un second produit de valeur (voir Figure 19 pour des exemples de produits fréquemment utilisés en chimie fine). Avec le point de vue du chimiste, cette voie peut être intéressante pour générer *in situ* du peroxyde d'hydrogène pour des réactions d'oxydation sans avoir la nécessité de stocker un oxydant sur site.⁵¹ La réaction d'intérêt devient donc celle exploitant H₂O₂ plutôt que la réaction enzymatique. Selon le côté duquel on se place, la combinaison d'une enzyme oxydase avec un catalyseur d'oxydation utilisant H₂O₂ comme agent oxydant peut présenter un intérêt pour le biochimiste et/ou pour le chimiste.

Dès 2010, de nombreuses cibles potentielles ont été identifiées par des groupes précurseurs dans l'utilisation de la catalyse hétérogène pour la valorisation de composés biosourcés, et notamment les chercheurs danois de l'entreprise Haldor Topsøe, associés à l'Université Technique du Danemark et à Novozymes, ont publié un article « Concepts » dans ChemCatChem⁵² prévoyant que des zéolithes du type TS-1 (Titanium Silicalite-1) ou Ti-β, Ti-MOR, Ti-MCM-22 pourraient être des catalyseurs de choix pour exploiter le peroxyde d'hydrogène libéré par des enzymes oxydases. Ces zéolithes ont été décrites pour catalyser les réactions dans des conditions de température douces, donc compatibles

⁵⁰ H. L. Holland *Organic Synthesis with Oxidative Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim, **1992**.

⁵¹ B. Martin, J. Sedelmeier, A. Bouisseau, P. Fernandez-Rodriguez, J. Haber, F. Kleinbeck, S. Kamptmann, F. Susanne, P. Hoehn, M. Lanz, L. Pellegatti, F. Venturoni, J. Robertson, M. C. Willis, B. Schenkel *Green Chem.* **2017**, in press, doi10.1039/C6GC02899C.

⁵² P. N. R. Vennestrom, C. H. Christensen, S. Pedersen, J.-D. Grunwaldt, J. M. Woodley *ChemCatChem* **2010**, *2*, 249-258.

avec une activité enzymatique ($< 100^{\circ}\text{C}$).⁵³ Leur potentiel comme candidat à une mise en œuvre couplée à une oxydation enzymatique de catalyse hybride avait à cette époque d'ores et déjà été évoqué.

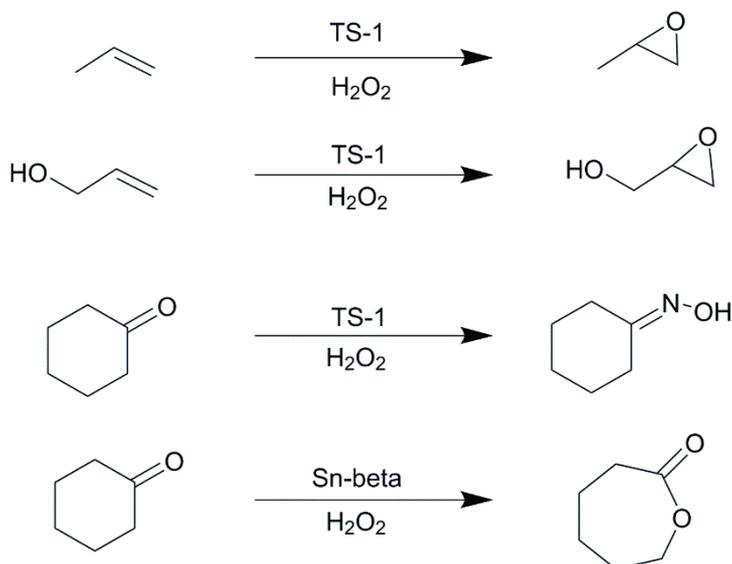


Figure 19 Exemples sélectionnés d'oxydation en conditions catalysés par des zéolithes en présence de H_2O_2

Le concept a donc été validé par le même groupe dans le même volume de ce journal en combinant l'oxydation enzymatique du glucose en acide gluconique à l'oxydation de l'alcool allylique en glycidol (Figure 20).⁵⁴

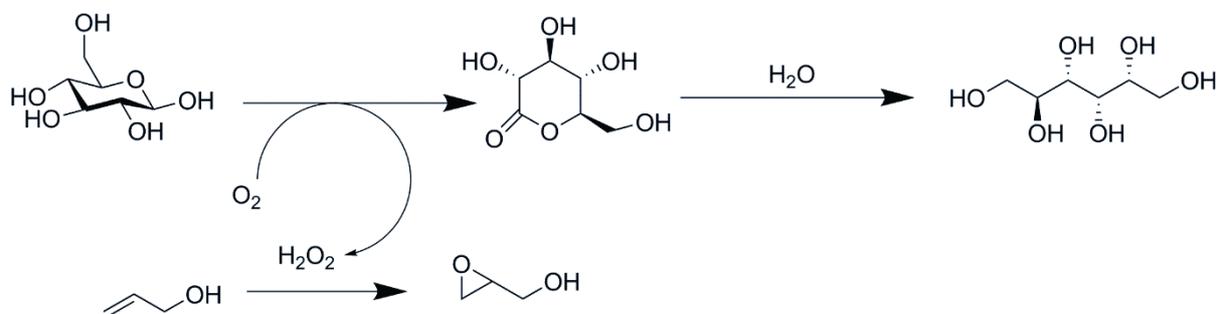


Figure 20 Exemple de catalyse hybride pour valoriser le peroxyde d'hydrogène libéré par la glucose oxydase

Le principal verrou de cette approche, tout comme dans tout exemple de catalyse hybride, est l'harmonisation des cinétiques réactionnelles : si le catalyseur chimique est trop lent pour éliminer H_2O_2 , son accumulation ne sera pas empêchée et l'enzyme risque d'être désactivée irréversiblement.

⁵³ (a) M. G. Clerici, G. Bellussi, U. Romano *J. Catal.* **1991**, *129*, 159-167. (b) T. Tatsumi, M. Yako, M. Nakamura, Y. Yuhara, H. Tominaga *J. Mol. Catal.* **1993**, *78*, L41-L43. (c) A. Corma, L. T. Nemeth, M. Renz, S. Valencia *Nature* **2001**, *412*, 423-425.

⁵⁴ P. N. R. Vennestrom, E. Taarning, C. H. Christensen, S. Pedersen, J.-D. Grunwaldt, J. M. Woodley *ChemCatChem* **2010**, *2*, 943-945.

Un travail important d'optimisation sur les conditions réactionnelles et de design de catalyseurs est donc nécessaire avec une étude au cas par cas pour chaque enzyme et réaction d'intérêt.

Parallèlement, des avancées spectaculaires sont à noter dans l'évolution dirigée de nouvelles souches enzymatiques pour leur résistance au peroxyde d'hydrogène. Un groupe japonais a par exemple multiplié par 9 la stabilité d'une enzyme manganese peroxydase de souche naturelle.⁵⁵ Ces avancées permettent de libérer les contraintes cinétiques dans l'optique d'une opération en catalyse hybride. Chimistes et biochimistes travaillent donc de concert pour lever ce verrou important pour un déploiement à plus grande échelle.

L'exemple du procédé Cetus, mis au point dans les années 80 et abandonné pour cause de non-profitabilité, pourrait par exemple profiter du développement de la catalyse hybride pour retrouver une attractivité commerciale.⁵⁶ Le procédé visait une transformation chémoenzymatique quantitative en deux étapes en fructose, sans isomérisation, pour s'affranchir de l'équilibre thermodynamique induit par la glucose isomérase et d'une séparation complexe entre glucose et fructose. Les applications du fructose à cette époque étaient uniquement liées à son pouvoir sucrant dans l'industrie alimentaire (fructose pur ou mélanges synthétiques glucose/fructose type High Fructose Corn Syrup non issu de l'isomérisation enzymatique classique), donc à plutôt faible valeur ajoutée. La production sélective de fructose à partir de glucose reprend aujourd'hui une importance grandissante par l'intérêt croissant pour le 5-HMF, dont l'obtention sélective est favorisée avec une charge fructose.

Précisément, le procédé Cetus proposait une première étape enzymatique avec l'oxydation sélective et quantitative du *D*-glucose en *D*-glucosone. La réduction du *D*-glucosone catalysée par du Pd/C fournissait également sélectivement le *D*-fructose (Figure 21).

⁵⁵ C. Miyazaki-Inamura, K. Oohira, R. Kitagawa, H. Nakano, T. Yamane, H. Takahashi *Protein Eng.* **2003**, *16*, 423-428.

⁵⁶ Cetus Corporation, **1980**, Patent EP0028136.

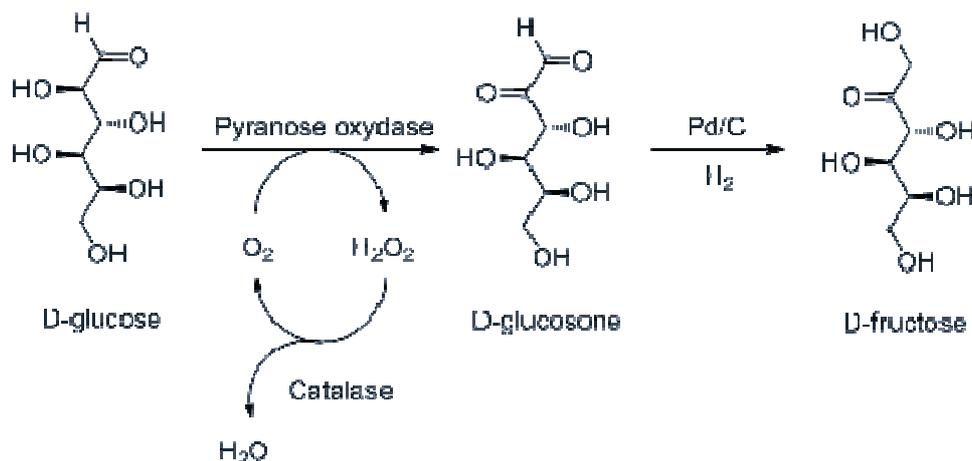


Figure 21 Procédé Cetus comme développé en 1980 par Cetus Corporation

La faible valeur ajoutée du fructose comme agent sucrant comparativement à une application en chimie fine *via* le 5-HMF mériterait vraiment que ce procédé soit réétudié. Dans le procédé original, le peroxyde d'hydrogène était dégradé par une catalase. Une condition pour rentabiliser ce procédé serait de trouver une cible produit complémentaire avec les caractéristiques suivantes :

- Taille de marché proche de celle du fructose ;
- séparation fructose/produit peu contraignante.

Pour éviter ces contraintes de marché, la catalyse chimique pourrait jouer le rôle de la catalase en dégradant le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau, oxygène qui pourrait être réutilisé par l'enzyme oxydase comme oxydant. Afin de limiter les interactions et faciliter la séparation, des catalyseurs hétérogènes redox actifs pourraient être intéressants. Des matériaux de type solides de Fenton utilisés pour le traitement de l'eau pourraient constituer des solutions attractives.

Lors de la réflexion autour de cette thèse, cette problématique a été mentionnée comme une possibilité d'axe de recherche avec la transformation quantitative de glucose en fructose comme réaction d'intérêt, issue du procédé Cetus.

La prochaine partie détaille l'autre verrou majeur identifié dans le domaine de la catalyse enzymatique pour lequel la catalyse hybride pourrait apporter des solutions : la régénération des cofacteurs des enzymes oxydo-réductases.

2 Régénération de cofacteurs

Contrairement aux précédents exemples chémoenzymatiques et hybrides, la régénération de cofacteurs enzymatiques n'a jamais été mentionnée dans les mini-revues et publications de concept sur la combinaison entre catalyse biologique et catalyse chimique publiées ces dernières années.

Contrairement aux ressources fossiles, la biomasse lignocellulosique présente un rapport oxygène/carbone élevé avec des fonctions chimiques diverses telles que alcools et aldéhydes pour les sucres, éthers et phénols pour la lignine. Pour transformer sélectivement en conditions douces ces ressources, les enzymes de la famille des oxydoréductases paraissent adaptées.

Parmi ces produits biosourcés, les sucres et les sucres-alcools occupent une place privilégiée avec le glucose, le fructose et le sorbitol pour les tonnages les plus importants. Pour effectuer des modifications sélectives de ces fonctions oxygénées, par exemple, pour transformer un polyol en un cétose ou un aldose sur une position bien spécifique, ou sélectivement réduire un sucre en un épimère précis, les alcools déshydrogénases de la famille des oxydoréductases semblent bien adaptées.

Dans la classification des enzymes, la classe des oxydoréductases est la plus représentée.⁵⁷ Leur cofacteur associé est indispensable à leur fonctionnement. Les nicotinamides [NAD(P)H/NAD(P)⁺] sont les couples de cofacteurs les plus usuellement utilisés (Figure 22). En effet, 80% des oxydoréductases connues utilisent le couple NAD/NADH comme cofacteur et 10% leur forme phosphorylée NADP/NADPH.⁵⁸ Les autres familles de cofacteurs sont plus confidentielles, comme les couples FAD/FADH₂, FMN/FMNH₂ ou PQQ/PQQH₂. Ces cofacteurs sont transformés stœchiométriquement par l'enzyme par rapport au substrat lors de la réaction. Leur prix élevé⁵⁹ combiné aux quantités stœchiométriques à engager dans la réaction limitent fortement l'économie de la mise en échelle de ces réactions sans régénération du cofacteur.

Dans ce paragraphe, et dans toute la suite du manuscrit, on entendra par régénération du cofacteur X la production de ce cofacteur X. Par exemple, pour une réaction de réduction enzymatique, NADH est parallèlement oxydé en NAD⁺. Pour maintenir l'activité de l'enzyme, NADH doit être régénéré. La régénération de NADH correspondra à la réduction de NAD⁺ en NADH.

⁵⁷ W. Liu, P. Wang, *Biotechnol. Adv.*, **2007**, *25*, 369–384.

⁵⁸ H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.*, **2013**, *15*, 1773-1789.

⁵⁹ Prix Sigma-Aldrich octobre 2016 : 639 €/g

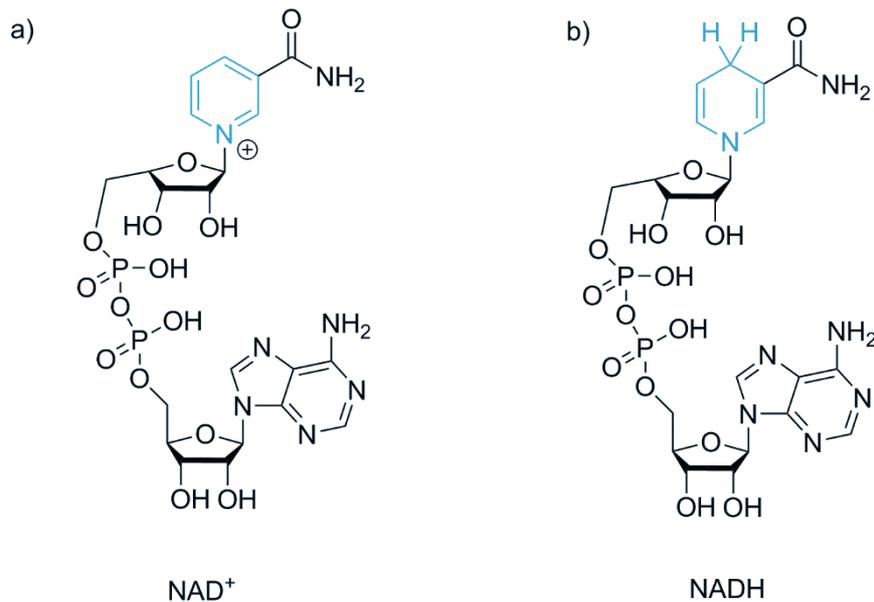


Figure 22 Molécules de NAD⁺ (a) et NADH (b).

L'élaboration d'un système de régénération efficace nécessite la prise en compte de plusieurs paramètres comme :

- La stabilité de l'enzyme et de son cofacteur ;
- les conditions opératoires ;
- l'avancement de la réaction ;
- la compatibilité des vitesses de réaction ;
- les méthodes de séparation/purification/isolément des différents substrats et produits.

Il existe plusieurs méthodes de régénération communément décrites dans la littérature : les systèmes de régénération enzymatiques et les systèmes de régénération chimiques. Nous présenterons dans un premier temps succinctement le principe de régénération enzymatique et les verrous rencontrés lors de sa mise en œuvre. Nous verrons ensuite quelles solutions chimiques pertinentes ont été décrites pour leur substituer et quelles perspectives de recherche en catalyse hybride pourraient être proposées dans ce cadre.

2.1 Régénération enzymatique

Deux approches peuvent être envisagées lors d'une régénération enzymatique d'un cofacteur. La première, dite à substrat couplé, va employer l'enzyme de production pour régénérer le cofacteur (Figure 23 à gauche). En plus du substrat à transformer, l'ajout d'un second substrat sacrificiel va permettre de réaliser les deux réactions - synthèse et régénération.

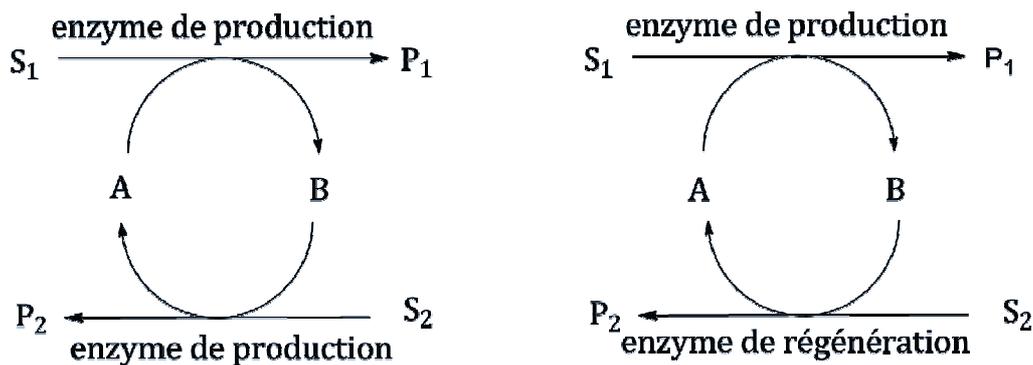


Figure 23 Régénération enzymatique de cofacteur

Le premier cas est très peu appliqué pour plusieurs raisons : très peu d'enzymes ont une activité pour deux substrats différents S₁ et S₂. La régénération du cofacteur par la transformation de S₂ en P₂ va occuper des sites catalytiques et ralentir la production de P₁ à partir de S₁. Pour être efficace, la régénération doit en plus préférentiellement se faire en présence d'un excès de S₂, ce qui ralentit d'autant plus la réaction d'intérêt. La présence potentielle de 4 produits organiques dans ce cas (S₁, S₂, P₁, P₂) rend la séparation des produits compliquée.

La seconde approche, dite à enzyme couplée, va également utiliser un second substrat mais en présence d'une seconde enzyme (Figure 23 à droite). Ce cas fait l'objet d'importants efforts de recherche. La méthode de régénération la plus employée et la seule utilisée industriellement est celle impliquant l'enzyme formate déshydrogénase (FDH) et le formate. La régénération du NADH est donc accompagnée de production de dioxyde de carbone comme décrit dans la Figure 24. Pour éviter des étapes de séparation fastidieuses des substrats ou produits organiques de régénération (S₂ et P₂ en Figure 23), il est judicieux de choisir ce type de couples substrat/produit inorganiques facilement séparables. L'enzyme de régénération FDH engage le couple CO₂/HCOO⁻, ce dernier étant évacué du système dans la phase gaz. Des couples redox comme O₂/H₂O ou H₂O/H₂ peuvent être aussi des couples de choix pour des mises en œuvre facilitées et moins coûteuses.

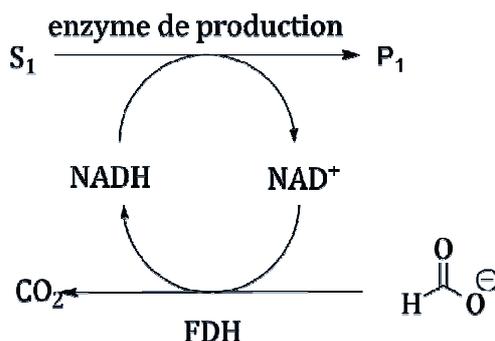


Figure 24 Régénération enzymatique du cofacteur avec l'enzyme FDH

Même si le produit de régénération peut être facilement évacué du milieu réactionnel dans le cas de la FDH, l'inconvénient majeur de cette méthode provient du coût de production de l'enzyme de régénération. L'ajout d'acide formique/formiate selon le pH peut par ailleurs produire un effet inhibiteur sur l'enzyme de production.⁶⁰

Dans le cas d'une réaction d'oxydation, couplée donc à une réduction de NAD^+ en NADH , la régénération enzymatique de NAD^+ est menée de préférence avec l'enzyme NADH-oxydase.⁶¹ Cette dernière réduit le dioxygène en peroxyde d'hydrogène. Cependant, la cinétique de régénération est très lente⁶² et l'eau oxygénée formée possède de nombreux effets néfastes pour les réactions enzymatiques.⁶³ On retrouve le verrou mentionné dans la partie précédente avec le même type de méthodologie à mettre en œuvre pour éliminer le peroxyde d'hydrogène. Des triples combinaisons très complexes oxydoréductase/NADH-oxydase/catalase doivent ainsi être mises en place. Dans ce cadre, une simple régénération par catalyse hybride avec l'enzyme et un catalyseur chimique peut être grandement préférée.

Pour pallier les désagréments de la régénération enzymatique de cofacteur, des méthodes non-enzymatiques ont donc fait l'objet de nombreuses études que nous allons décrire globalement par grande famille de catalyseurs.

2.2 Régénération chimique

Dans le cadre d'une régénération chimique du cofacteur, une molécule doit transférer de façon sélective les charges entre un agent réducteur ou oxydant et le cofacteur. Pour cela, différents types de catalyses chimiques ont été envisagés.

⁶⁰ A. Arora, E. M. Martin, M. H. Pelkki, D. J. Carrier *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2013**, *1*, 23-28.

⁶¹ Z. Findrik, I. Simunovi, D. Vasi, *Biochem. Eng. J.* **2008**, *39*, 319-327.

⁶² J. Hirano, K. Miyamoto, H. Ohta, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *80*, 71-78.

⁶³ F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, *ChemCatChem*, **2010**, *2*, 762-782.

2.2.1 Régénération par des sels inorganiques

Des sels inorganiques ont été testés pour la régénération du NADH comme le dithionite de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou le borohydrure de sodium NaBH_4 ,⁶⁴ agents réducteurs classiques en chimie organique. À de fortes concentrations, ces sels engendrent toutefois la désactivation des enzymes.⁶⁵ De plus, ces sels sont utilisés stœchiométriquement et sans procédure de traitement. Il y a donc des conséquences sur le coût de mise en œuvre et la pollution générée. Bien que la régénération de NADH soit rapportée, on peut noter qu'aucune solution pour la régénération de NAD^+ n'est proposée avec des équivalents de sels oxydants.

2.2.2 Catalyse organique

D'après la littérature, la molécule organique permettant la régénération la plus efficace de NAD^+ trouvée à ce jour est la PyrroloQuinoléineQuinone (PQQ ou méthoxanine) en Figure 25. C'est également un cofacteur à part entière de la glucose déshydrogénase quinoprotéine, par exemple

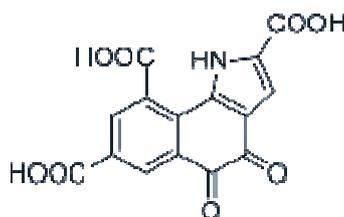


Figure 25 Molécule de PQQ utilisée pour la régénération de NAD^+

Après avoir transféré un hydruire à partir de NADH et un proton du milieu, la PQQ est réduite en PQQH_2 avec régénération de NAD^+ . La PQQH_2 réduit ensuite une mole de dioxygène du milieu pour former du peroxyde d'hydrogène en régénérant la PQQ. Cette méthode permet ainsi d'introduire le cofacteur en quantité catalytique par rapport au substrat (1:20), et le rendement atteint est de 75%, ce qui équivaut à un turnover number (TON = nombre de moles transformées par mole de catalyseur) de 15,6 pour le NAD^+ .⁶⁶ Tout comme la NADH oxydase, cette molécule organique a comme principal inconvénient la production de peroxyde d'hydrogène qui est un inhibiteur de nombreuses enzymes.

2.2.3 Catalyse hétérogène

Très récemment, le tout premier exemple de régénération de cofacteur nicotinamide par un catalyseur hétérogène a été rapporté par l'équipe de Yiu.⁶⁷ Le catalyseur utilisé dans cet exemple

⁶⁴ H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang *Green Chem.* **2013**, *15*, 1773–1789.

⁶⁵ K. Goldberg, K. Schroer, S. Lütz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237–48.

⁶⁶ S. Itoh, M. Kinugawa, N. Mita, *J. Chem. Soc.* **1989**, 694–695.

⁶⁷ X. Wang, H. H. P. Yiu *ACS Catal.* **2016**, *6*, 1880–188.

pour la régénération du NADH est du platine sur de l'alumine Pt/Al₂O₃. Sous une pression de 9 bar d'hydrogène en phase aqueuse, le catalyseur a démontré un rendement de régénération de 50% en 6 h de réaction à 37°C. Le système de régénération a ensuite été utilisé *in situ* avec une transformation de propanal en propanol catalysée par une alcool déshydrogénase issue de la souche *Saccharomyces cerevisiae*. Les rendements de régénération sont quantitatifs avec une quantité catalytique de cofacteur. Il faut tout de même noter dans cet exemple une quantité élevée de cofacteur par rapport au substrat ([propanal] = 0,50 mM, [NADH] = 0,37 mM ; [NADH]/[propanal] = 0,74) qui rend sa régénération moins critique (Figure 26).

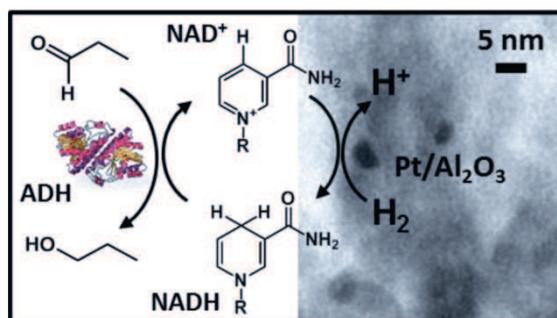


Figure 26 Régénération de NADH par un catalyseur hétérogène Pt/Al₂O₃

La méthode de régénération est sélective envers NADH malgré les différents sites d'hydrogénation possible menant à la formation de 1,6-NADH. Un couplage bimoléculaire de NAD⁺ sous un surpotentiel électrique peut aussi mener à un autre produit de dégradation noté NAD₂ via un couplage radicalaire.

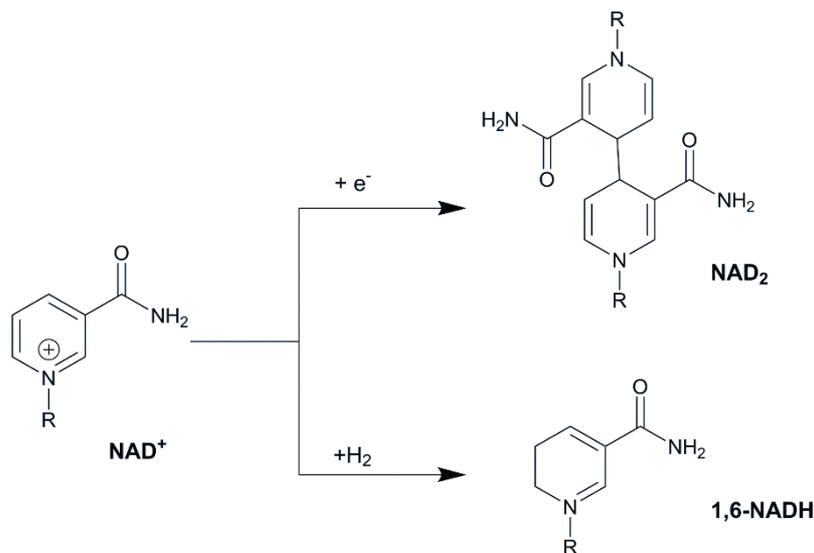


Figure 27 Voie de dégradation de NAD⁺ en NAD₂ ou 1,6-NADH

L'hydrogénation directe du propanal en propanol par le platine supporté est aussi réalisable. Cependant, elle nécessite des températures plus élevées et la sélectivité n'est pas excellente. On observe dans ce cas un phénomène se rapprochant d'un spillover de l'hydrogène entre le platine et le cofacteur nicotinamide.

2.2.4 Électrocatalyse et photocatalyse

Ces deux voies sont basées sur le même principe de transfert électronique entre un agent de transfert de charge à partir d'une source d'énergie lumineuse ou électrique. Dans tous les exemples, la régénération étudiée est la réduction de NAD^+ en NADH .

La régénération électrochimique est bien documentée et se décline en deux voies : une voie directe sur électrode⁶⁸ ou une voie indirecte *via* un complexe organométallique jouant le rôle de médiateur pour accélérer les transferts de charge entre le cofacteur et l'électrode. Les premiers systèmes sont décrits dès 1987 par le groupe de Steckhan, pionnier dans la régénération non enzymatique de cofacteurs, avec les premiers complexes organométalliques à base de rhodium.⁶⁹ Le formate est utilisé comme co-substrat pour générer l'espèce active hydrure cationique de rhodium $[\text{H-Rh(III)}]^+$.⁷⁰ L'amélioration de ce système est obtenue en immobilisant le complexe et le cofacteur sur une membrane PEGylée.⁷¹ Pour atteindre de bonnes performances, l'application de surpotentiels est souvent nécessaire. Les transferts électroniques peuvent mener à des voies de couplage radicalaire pour former NAD_2 par exemple. Les systèmes de la littérature sont aussi rarement expérimentés en présence d'un cofacteur issu d'une réaction enzymatique *in situ*. Le concept est validé mais peu de perspectives sont ouvertes en catalyse hybride.

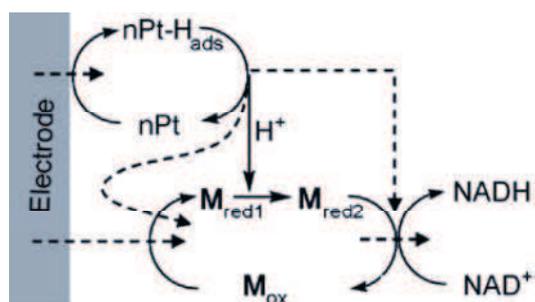


Figure 28 Schéma de principe de régénération électrochimique indirecte de NADH avec une électrode de Pt et un médiateur organométallique (Flèches pointillées = transfert électronique)

⁶⁸ (a) I. Ali, S. Omanovic *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 4283-4304. (b) I. Ali, T. Khan, S. Omanovic *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2014**, *387*, 86-91.

⁶⁹ R. Ruppert, S. Herrmann, E. Steckhan *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6583-6586.

⁷⁰ (a) H. K. Song, S. H. Lee, K. Won, J. H. Park, J. K. Kim, H. Lee, S.-J. Moon, D. K. Kim, C. B. Park *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1749-1752. (b) F. Hildebrand, S. Lütz *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 4998-5001.

⁷¹ E. Steckhan, S. Herrmann, R. Ruppert, J. Thömmes, C. Wandrey *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 388-390.

Avec les progrès récents de la photocatalyse, de nouveaux systèmes peuvent être exploités pour la régénération de cofacteurs. Des médiateurs basés sur des complexes de rhodium peuvent transférer les électrons issus du stimulus photochimique reçu par exemple par un nitrure de carbone.⁷² Une version supportée a vu le jour en coordinant le complexe de rhodium-bipyridine sur un polymère poly-arylène photosensible (Figure 29).⁷³ Récepteur et médiateur ne forment plus qu'une unique entité pour favoriser le transfert de charge et la séparation post-régénération. Pour ces voies photoactivées, des améliorations sont attendues en termes de productivité et de sélectivité des transferts électroniques.

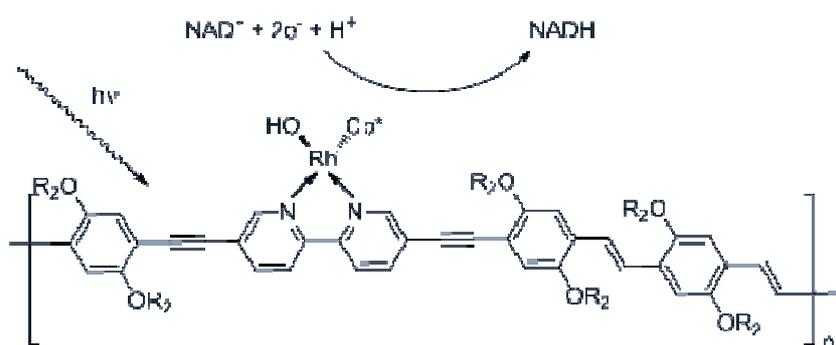


Figure 29 Régénération de NADH photocatalysée par un système polymère photosensible/rhodium supporté

Ces premiers exemples montrent que les métaux de transition jouent un rôle prépondérant dans le transfert de charge et d'hydrogène. Dans les dix dernières années, le développement de la chimie organométallique en phase aqueuse a connu un développement exponentiel notamment avec les métaux de transition des groupes 8, 9 et 10. La réaction réduction photochimique de l'eau pour produire de l'hydrogène⁷⁴ ou la réaction d'oxydation de l'eau pour produire du dioxygène comme mime du photosystème des plantes ont entraîné la percée d'une série de catalyseurs organométalliques actifs en phase aqueuse basée principalement sur l'iridium,⁷⁵ mais aussi sur le platine et le ruthénium.⁷⁶ Les complexes de ces métaux deviennent alors des candidats intéressants à mettre en œuvre en combinaison avec des enzymes : nous décrivons par la suite les premiers travaux impliquant de tels complexes pour la régénération de cofacteurs nicotinamides couplés à des enzymes oxydoréductases.

⁷² J. Liu, M. Antonietti *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6*, 1486–1493.

⁷³ T. K. Oppelt, J. Gasiorowski, D. A. M. Egbe, J. P. Kollender, M. Himmelsbach, A. W. Hassel, N. S. Sariciftci, G. Knor *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12721–12729.

⁷⁴ Z. Han, R. Eisenberg *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2537–2544.

⁷⁵ J. M. Thomsen, D. L. Huang, R. H. Crabtree, G. W. Brudvig *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 12452–12472.

⁷⁶ L. Duan, F. Bozoglian, S. Mandal, B. Stewart, T. Privalov, A. Ilobet, L. Sun *Nature Chem.* **2012**, *4*, 418–423.

III Régénération de cofacteur par des complexes organométalliques

1 Catalyse organométallique biomimétique : mime d'enzymes et régénération de cofacteurs

Dans la photosynthèse naturelle, les électrons et les protons extraits de l'eau grâce à l'énergie solaire sont utilisés pour réduire NAD(P)^+ par l'action de l'enzyme ferrédoxine-NADP réductase pour générer NAD(P)H , utilisé pour fixer le CO_2 sous forme de sucres de manière réductrice au sein du cycle de Calvin.⁷⁷ La ferrédoxine est une protéine comportant des clusters fer-soufre dont les atomes métalliques oscillent entre les degrés d'oxydation +II et +III. Les métaux de transition jouent donc un rôle prépondérant dans la catalyse enzymatique.⁷⁸ D'une part l'enzyme peut être dépendante d'un ou plusieurs ions métalliques pour maintenir une structure tridimensionnelle stable et/ou un site actif fonctionnel, sans que le métal ne soit directement engagé dans l'action catalytique. D'autre part, le métal peut être lui-même responsable de l'activité catalytique au sein du site actif : par exemple, des métaux abondants comme le nickel et le fer, intégrées au sein d'une matrice protéique, sont les sites actifs des enzymes de la famille des hydrogénases, dont la synthèse artificielle connaît un développement fulgurant ces dernières années avec le travail des groupes français de Marc Fontecave ou Vincent Artero.⁷⁹

Les chercheurs se sont naturellement orientés vers la catalyse biomimétique (ou bioinspirée) en cherchant à remplacer les métalloenzymes par des complexes organométalliques plus simples, souvent polynucléaires, et qui rempliraient les mêmes fonctions.⁸⁰ La synthèse artificielle de ces complexes appelés aussi « biohybrides » peut de plus s'inspirer elle-même des chemins de maturation naturels. Ainsi, un complexe binucléaire Ni-Mn mimant le site actif d'une hydrogénase [NiFe] peut être préparé par maturation bioinspirée d'un cluster $\text{Mn}(\text{CO})_3$ -lysozyme (le complexe de manganèse est en interaction avec un résidu histidine du lysozyme) avec un précurseur de nickel-thiolate de type $\text{Ni}(\text{xbsms})$.⁸¹

Les travaux pionniers dans le domaine datent de la fin des années 80 avec la première version organométallique de régénération de cofacteur par le groupe d'Eberhard Steckhan à l'aide de

⁷⁷ (a) H. Dau, M. Haumann *Coord. Chem. Rev.* **2008**, 252, 273–295. (b) J. Yano, J. Kern, K. Sauer, M. J. Latimer, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, W. Saenger, J. Messinger, A. Zouni, V. K. Yachandra *Science* **2006**, 314, 821–825.

⁷⁸ C. Andreini, I. Bertini, G. Cavallaro, G. L. Holliday, J. M. Thornton *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, 13, 1205–1218.

⁷⁹ V. Artero, M. Fontecave *Coord. Chem. Rev.* **2005**, 249, 1518–1535.

⁸⁰ V. Artero, G. Berggren, M. Atta, G. Caserta, S. Roy, L. Pecqueur, M. Fontecave *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 2380–2387.

⁸¹ M. Razavet, V. Artero, C. Cavazza, Y. Oudart, C. Lebrun, J. C. Fontecilla-Camps, M. Fontecave, *Chem. Commun.* **2007**, 43, 2805–2807. (H_2xbsms = 1,2-bis(4-mercapto-3,3-diméthyl-2-thiabutyl)-benzène)

complexes de rhodium. L'objectif est de remplacer la FDH par un complexe organométallique qui remplirait le même rôle de régénération de NADH mais serait :

- Moins sensible que l'enzyme à l'inhibition par le cofacteur réduit ;
- en capacité de convertir totalement le cofacteur oxydé ;
- transposable indifféremment entre les systèmes NAD et NADP.

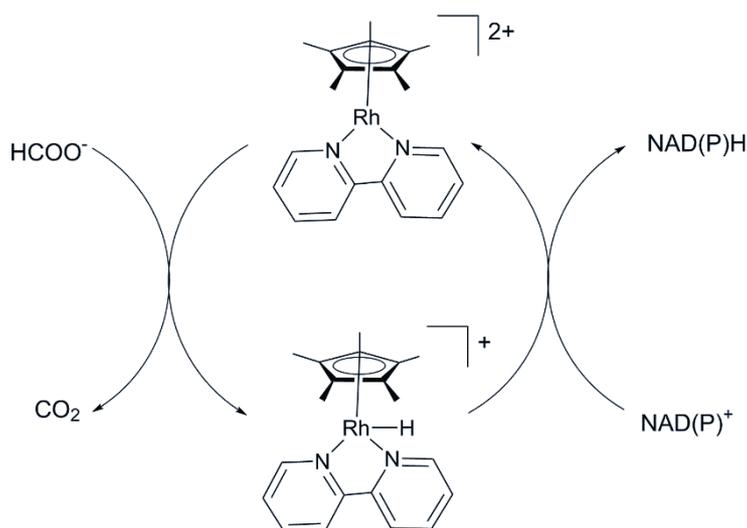


Figure 30 Premier exemple de régénération organométallique de cofacteur (NADH) avec un complexe cationique de rhodium

Les aspects mécanistiques ont ensuite été étudiés par Richard Fishet *coll.*⁸² sur des modèles de cofacteurs. L'utilisation de complexes organométalliques permet en effet de travailler avec des cofacteurs non naturels, modèles simplifiés des classiques NAD⁺ et NADH. Nous reviendrons plus tard sur les informations fournies par ces études mécanistiques.

L'intérêt pour ce domaine est revenu dans le courant des années 2000. Des groupes comme celui de Peter Sadler ont cherché à remplacer des enzymes de la classe des hydrogénases/déshydrogénases par des complexes organométalliques de ruthénium et d'iridium comme catalyseurs de réactions redox d'hydrogénation/déshydrogénation dont le cycle catalytique impliquerait l'utilisation de NAD comme cofacteur. Ces complexes ont initialement été mis au point pour leur activité anticancéreuse : leur interaction avec les cofacteurs de la famille nicotinamide utilisée par les enzymes de cellules malades mène celles-ci à l'apoptose.⁸³ Ces premières études de cytotoxicité ont amené les auteurs à s'apercevoir que les mêmes complexes étaient capables de mimer une activité de lactate déshydrogénases, par exemple, en exploitant NADH comme source d'hydrure pour la réaction

⁸² H. C. Lo, O. Buriez, J. B. Kerr, R. H. Fish *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3941–3946.

⁸³ Z. Liu, I. Romero-Canelon, B. Qamar, J. M. Hearn, A. Habtemariam, N. P. E. Barry, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson, P. J. Sadler *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3941–3946.

d'hydrogénation du pyruvate en lactate. Les structures de complexes de ruthénium utilisés sont basées sur des ligands pyrimidine dont la structure a été optimisée dans une étude préliminaire pour l'oxydation sélective du NADH en NAD^+ (Figure 31).⁸⁴

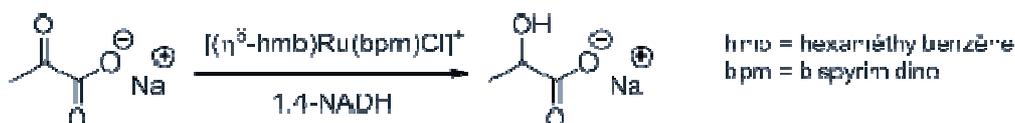


Figure 31 Catalyseur organométallique de Ru utilisant NADH comme cofacteur

En conclusion de leurs travaux, les auteurs annoncent avoir réalisé la même réaction à partir de NADH produit par une enzyme alcool déshydrogénase dans une première étape, sans régénération du cofacteur NAD^+ . Le NADH ainsi produit peut être utilisé par le complexe de ruthénium comme source d'hydrure pour hydrogéner le pyruvate.

Lors de cette transformation, un hydrure de ruthénium a été détecté par ^1H RMN avec un signal caractéristique à -7,5 ppm. Cet intermédiaire a permis aux auteurs de proposer un mécanisme de réaction détaillé en Figure 32.

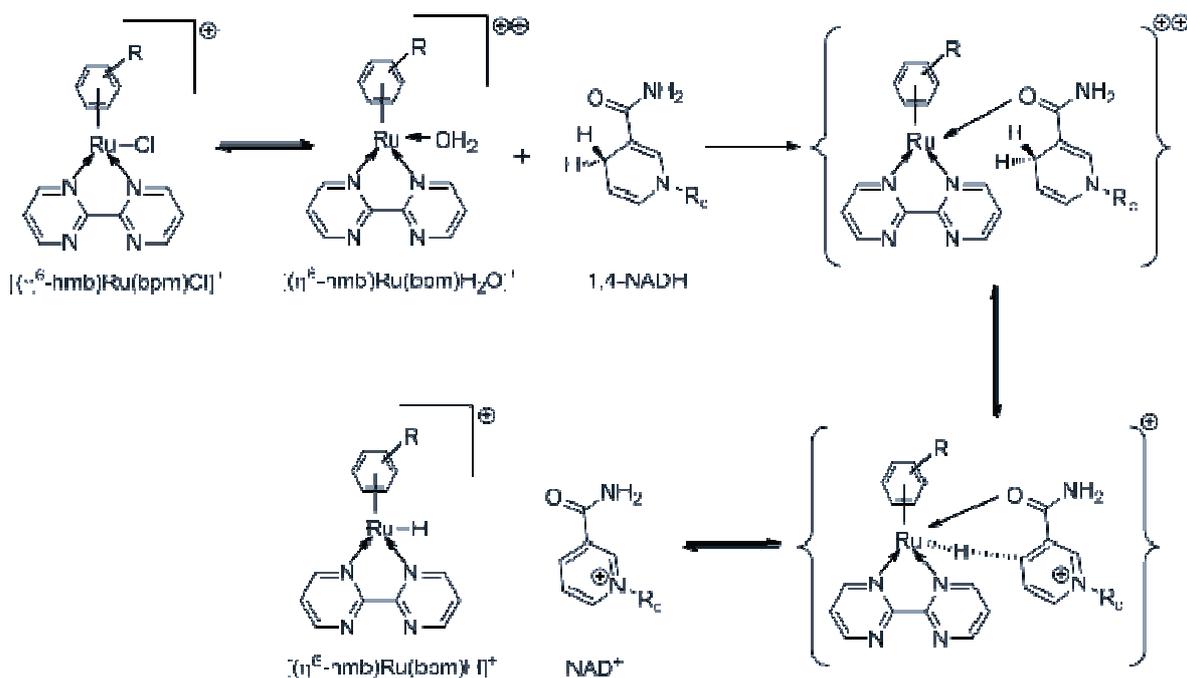


Figure 32 Mécanisme proposé pour la production de NAD^+ à partir de NADH impliquant la formation d'un hydrure de ruthénium

Un mécanisme similaire impliquant un intermédiaire Ir-H a été proposé par la même équipe avec des complexes $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})\text{H}_2\text{O}]$. Le transfert d'hydrure est réalisé par ce complexe à partir de NADH

⁸⁴ J. J. Soldevila-Barreda, P. C. A. Bruijninx, A. Habtemariam, G. J. Clarkson, R. J. Deeth, P. J. Sadler, *Organometallics*, **2012**, 31, 5958–5967.

pour réduire la benzoquinone en hydroquinone. Ainsi, la réaction catalysée par le complexe d'iridium produit du NAD^+ à partir de NADH (Figure 33)⁸⁵.

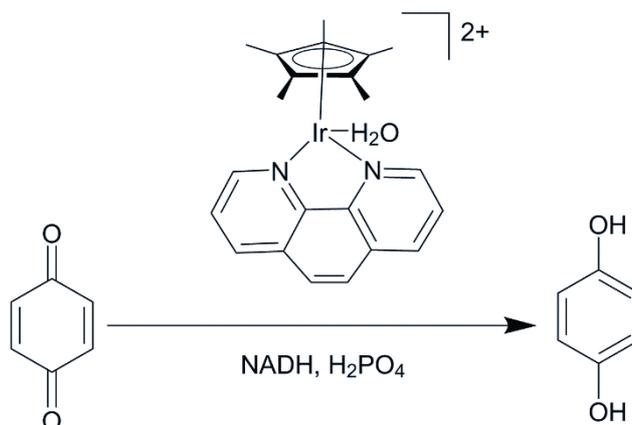


Figure 33 Réduction de la benzoquinone par un complexe d'iridium en présence de NADH

Dans cet article, l'équipe montre l'activité catalytique du complexe d'iridium ainsi que l'identification du NAD^+ par RMN ^1H . La réaction est suivie par RMN et la formation d'un métallo-hydrure est révélée par un signal à -11 ppm. Le complexe d'iridium joue aussi un rôle de mime enzymatique. Il démontre, tout comme avec le complexe de ruthénium de l'article précédent, que le complexe d'iridium a la possibilité de faire le transfert d'hydrure entre le NADH et la benzoquinone de manière catalytique (2%mol).

Plutôt que d'utiliser la réduction d'un composé organique (pyruvate ou benzoquinone) pour régénérer NAD^+ , ne peut-on pas tirer profit de cet hydrure de ruthénium ou d'iridium pour coupler une réaction de réduction de H_2O , H_3O^+ ou O_2 en H_2 ou H_2O_2 par exemple ? On pourrait ainsi exploiter l'eau comme source de protons ou d'électrons, selon le sens redox, comme pour la photosynthèse naturelle, et ne pas subir la présence de composés organiques qu'il faudra séparer ensuite.

Le système a donc évolué en ce sens avec l'article suivant du groupe de Sadler : aucune molécule organique n'est utilisée pour régénérer le catalyseur. La régénération du catalyseur a lieu avec l'eau, solvant de la réaction, et génère du dihydrogène. C'est le premier exemple d'un système de régénération de cofacteur nicotinamide sans l'ajout de molécule organique dans le système. Un mécanisme de régénération avec le complexe d'iridium est proposé dans la section *supporting information* de cet article, et est reporté Figure 34.

⁸⁵ Z. Liu, R. J. Deeth, J. S. Butler, A. Habte, M. E. Newton, P. J. Sadler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 4194–4197.

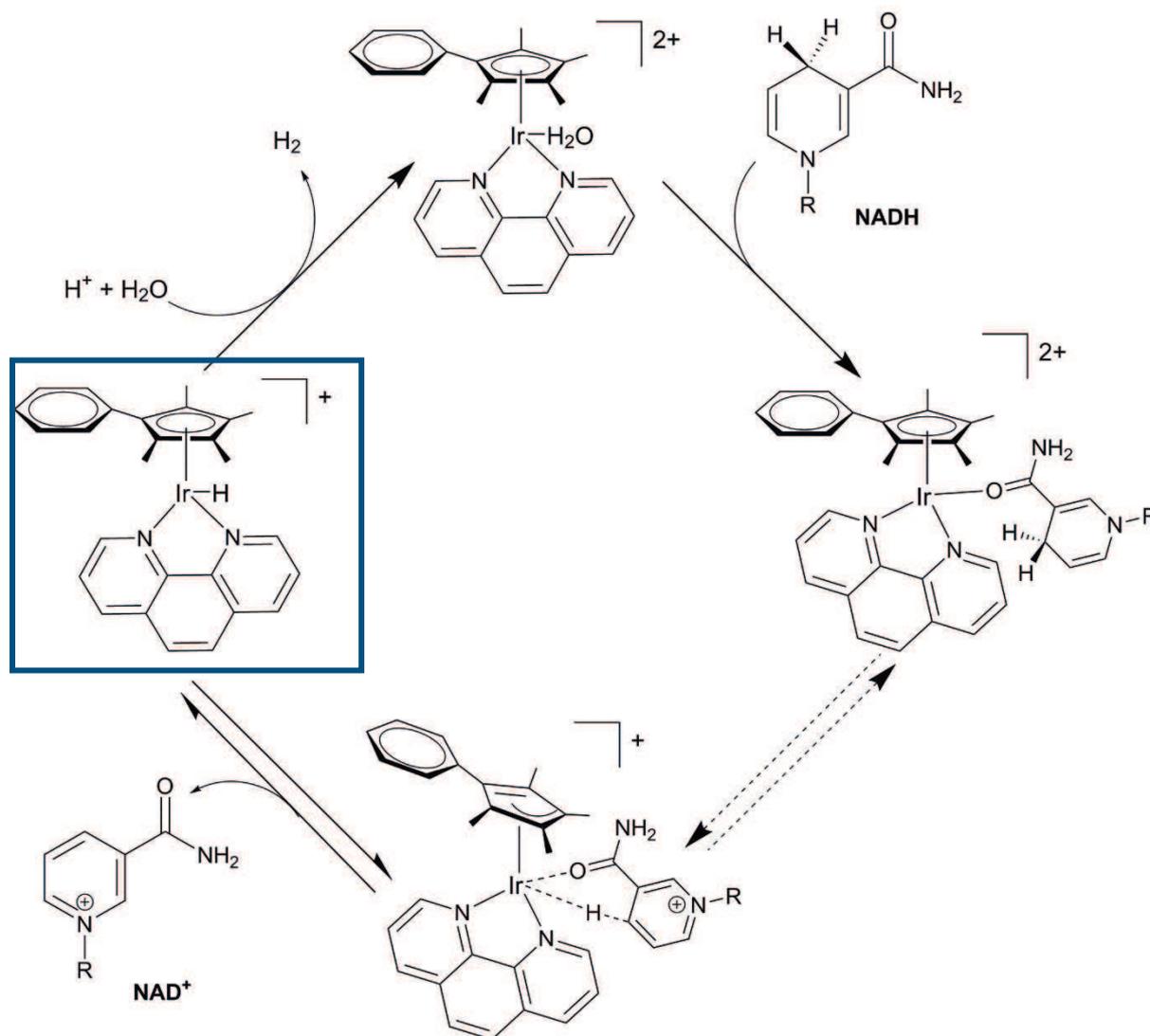


Figure 34 Mécanisme proposé par Sadler *et coll.* pour la régénération de NAD^+ avec un complexe organométallique d'iridium

C'est à notre connaissance le seul mécanisme proposé dans la littérature. L'avantage primordial de ce catalyseur est l'utilisation du solvant comme substrat pour la régénération. En effet, dans une optique de combinaison avec un catalyseur biochimique, cette propriété est très importante car elle permet de s'affranchir du problème de compatibilité entre l'enzyme et le substrat de régénération.

On voit dans la proposition de mécanisme de P. Sadler la formation d'une espèce hydruide d'iridium (encadrée en bleu dans la Figure 34) et la consommation d'un proton pour la formation de dihydrogène et la régénération du complexe aqua initial d'iridium. L'iridium garde ainsi son degré d'oxydation +III durant tout le mécanisme en passant par des états mono- et di-cationiques. Cependant, le mécanisme de reformation de l'espèce active n'est pas étudié : le mécanisme engagé est très différent de la réaction pour l'oxydation de l'eau. Aucun parallèle n'est ainsi possible et le mécanisme reste à étudier.

En effet le mécanisme d'oxydation de l'eau entraîne la perte de deux protons à partir du ligand aqua engendrant un changement de degré d'oxydation de l'iridium de III à V. L'espèce d'iridium V est suffisamment déficiente en électrons pour subir une réaction nucléophile de l'eau et ainsi former une liaison O-O comme le montre la Figure 35.

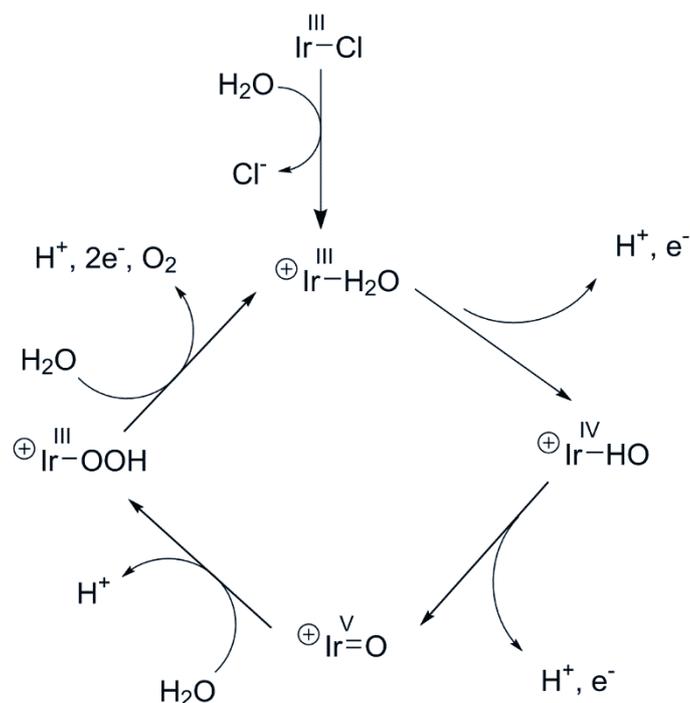


Figure 35 Mécanisme proposé pour l'oxydation de l'eau par un complexe d'iridium

Malgré les différences mécanistiques, les propositions de complexes d'iridium pour l'oxydation de l'eau restent un sujet d'inspiration pour la régénération de cofacteurs par catalyse organométallique. L'examen de la littérature permet de recenser un ensemble de complexes synthétisables et caractérisés. De plus, les intermédiaires de synthèse qui sont obtenus permettent de nous donner des informations sur les propriétés oxydantes du catalyseur.

Il faut également noter les travaux complémentaires menés avec des complexes d'iridium et les cofacteurs nicotinamides par l'équipe de S. Fukuzumi. Cette équipe a étudié l'interconversion entre le NADH et le NAD^+ à l'aide de complexe d'iridium possédant un ligand bidenté [C,N], comme illustré en Figure 36.⁸⁶

⁸⁶ Y. Maenaka, T. Suenobu, S. Fukuzumi *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 367–374.

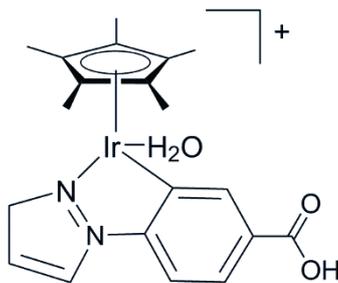


Figure 36 Complexe [N,C] d'iridium utilisé par l'équipe de Fukuzumi

Lors de la conversion du NADH en NAD⁺ en conditions légèrement acides, la formation du NAD⁺ est validée par analyse RMN ¹H. La réaction est suivie par la formation de H₂ selon la réaction décrite Figure 37.

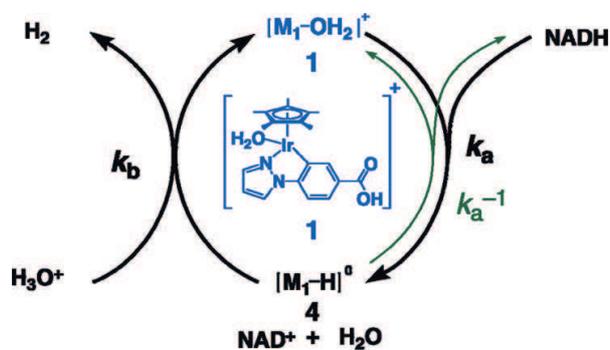


Figure 37 Conversion de NADH en NAD⁺ en conditions légèrement acides (pH = 4-6)

L'impact de la variation du pH a été examiné dans une gamme variant entre 4,1 et 6,1. Le TurnOver Frequency (TOF) correspondant au nombre de moles transformées par unité de temps et par mole de complexe, augmente avec la diminution du pH, donc la concentration en protons (Figure 38).

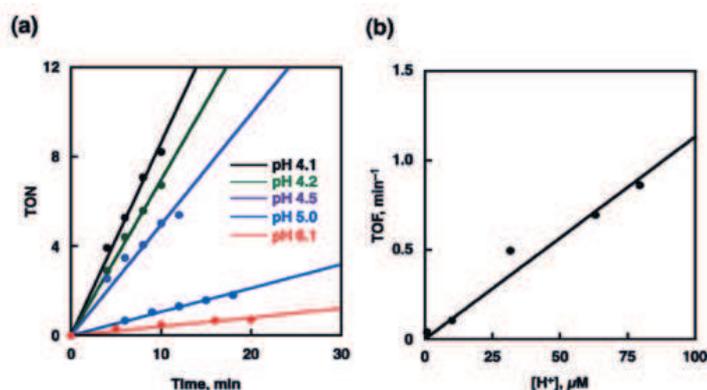


Figure 38 Variation du TON et du TOF selon le pH avec le catalyseur de l'équipe de Fukuzumi pour la formation de NAD⁺ à partir de NADH

A pH de 6,1, la réaction est très lente : les auteurs montrent en fait qu'à un pH proche de la neutralité et sous atmosphère d'hydrogène, c'est la réaction inverse qui opère avec consommation d'hydrogène et réduction de NAD^+ en NADH .

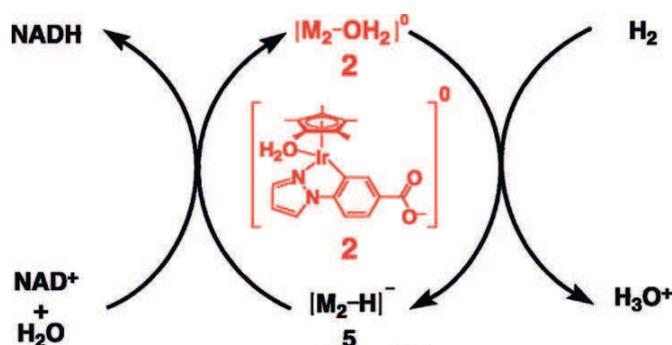


Figure 39 Conversion de NAD^+ en NADH en conditions neutres (pH = 7,0)

Le groupe de Fukuzumi a approfondi l'utilisation de ces complexes pour la réduction de NAD^+ en NADH catalysée par deux familles de complexes d'iridium [N,C] et [C,C] avec un alcool sacrificiel comme donneur d'hydrogène (Figure 40)⁸⁷ (Le complexe [C,C] est obtenu par simple photoirradiation du complexe [N,C] à $\lambda = 330 \text{ nm}$).

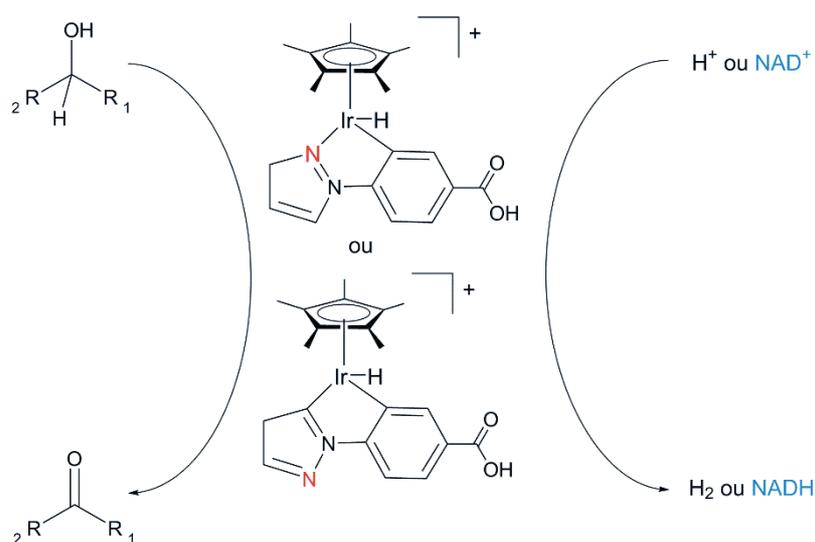


Figure 40 Conversion de NAD^+ en NADH avec un complexe d'iridium

Ces résultats montrent un effet critique du pH sur la réaction et valident une hypothèse du mécanisme proposé par Sadler *et coll.* (Figure 34) où un proton est consommé pour le retour à l'espèce active et le dégagement de H_2 . Cependant, aucune étude mécanistique détaillée de l'étape de régénération du NAD^+ n'est décrite dans cette publication. Des complexes d'iridium basés sur des

⁸⁷ Y. Maenaka, T. Suenobu, S. Fukuzumi *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9417–9427.

structures équivalentes ont aussi récemment été étudiés comme mimes d'enzymes oxydases par la même équipe, très prolifique sur le sujet.⁸⁸

Tous ces travaux des groupes de Sadler et Fukuzumi nous montrent que les complexes d'iridium, de rhodium ou de ruthénium portant des ligands Cp* et [N,N] ou [C,N] ont la capacité de régénérer le cofacteur NAD⁺ dans des conditions qui seraient compatibles avec une réaction enzymatique : dans l'eau, à température ambiante, éventuellement avec une atmosphère non pressurisée d'hydrogène, sans co-substrat organique pour transférer protons et électrons. Selon les conditions de pH, la réaction inverse de régénération de NADH peut aussi avoir lieu. En examinant ces articles sous l'angle du développement de la catalyse hybride dans le domaine de la régénération de cofacteurs, la question suivante se pose : l'exemple de Sadler montre qu'un complexe de ruthénium est capable d'hydrogéner le pyruvate en lactate en transformant NADH en NAD⁺. Ne pourrait-il donc pas servir à régénérer le cofacteur NAD⁺ lors d'une réaction couplée de déshydrogénation enzymatique ?

Ceci conforte l'intérêt d'envisager les différents complexes pour réaliser l'étape de régénération organométallique couplée à la catalyse enzymatique. L'activité des enzymes oxydoréductases de type hydrogénase/déshydrogénase est, entre autre, gouvernée par le pH dont l'ajustement leur permet de travailler dans un sens ou dans l'autre. Une fenêtre commune de pH de travail optimal sera donc la condition *sine qua non* au fonctionnement d'un système hybride.

L'approche hybride de régénération organométallique de cofacteurs a été envisagée dès 2007 mais trouve un regain d'intérêt important ces dernières années. L'intégralité des études de régénération de cofacteur par des complexes organométalliques est décrite sur la famille des nicotinamides. Parmi les exemples de synthèse chémoenzymatiques et hybrides rapportées jusqu'alors dans ce chapitre bibliographique, quelle que soit la voie de régénération envisagée, la majorité des enzymes oxydoréductases (alcool déshydrogénase (ADH) de *Rhodococcus sp.*, *Rhodococcus ruber*, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus kefir*), travaille dans le sens de la réduction. Le cofacteur NADH est donc parallèlement oxydé en NAD⁺ et la régénération nécessaire est la réduction de NAD⁺ en NADH. Peu d'exemples décrivent l'utilisation des enzymes oxydoréductases dans le sens de l'oxydation (autrement dit dans le sens de la déshydrogénation), l'exemple de Sadler étant le plus représentatif, même s'il n'est pas mis en œuvre en catalyse hybride mais en approche chémoenzymatique séquentielle. Dans le contexte de transformation de produits issus de la

⁸⁸ T. Suenobu, S. Shibata, S. Fukuzumi *Inorg. Chem.* **2016**, 55, 7747–7754.

biomasse comme les sucres, les composés carbonylés ou les composés (poly)hydroxylés, les deux sens réactionnels sont susceptibles de nous intéresser pour le développement d'un système de catalyse hybride adapté à la valorisation de la biomasse. Commençons par les systèmes hybrides mettant en œuvre la régénération de NADH.

2. Catalyse hybride de régénération de NADH

L'équipe de Süss-Fink est la première à utiliser des catalyseurs de rhodium, d'iridium et de ruthénium avec un ligand phénantroline pour la régénération de NADH en combinaison avec une réaction enzymatique.⁸⁹ Les réactions de régénération organométalliques impliquent les mêmes substrats qu'une enzyme de type FDH, à savoir le couple $\text{HCO}_2^-/\text{CO}_2$.

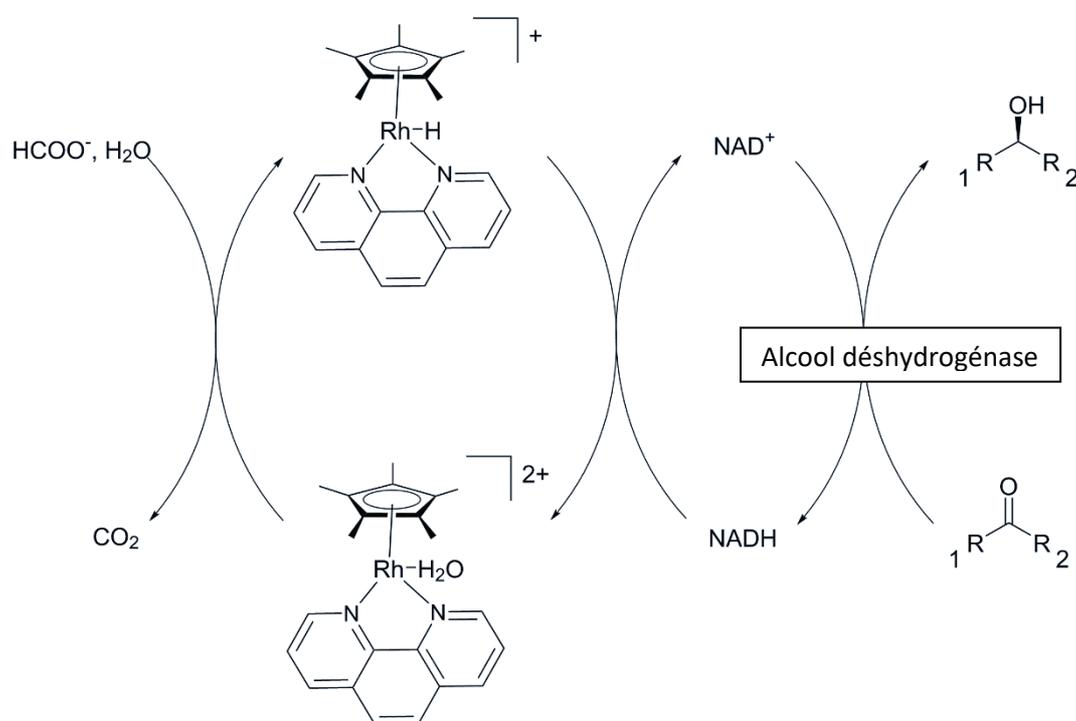


Figure 41 Réaction hybride de réduction enzymatique d'une cétone et régénération organométallique de NADH

Les complexes étudiés portent un ligand phénantroline fonctionnalisé ou non avec un groupement amine ou nitro et un ligand pentaméthylcyclopentadiène ou hexaméthylbenzène pour le ruthénium, inspirés des travaux pionniers de E. Steckhan⁹⁰ et R. Fish.⁹¹ Les catalyseurs de rhodium et d'iridium montrent des conversions totales dans des conditions qui seraient compatibles avec une réaction enzymatique ($T = 38^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7$). Un mécanisme a été proposé dans l'article de R. Fish mettant en

⁸⁹ J. Canivet, G. Süss-Fink, P. Štěpnička, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 4736–4742.

⁹⁰ G. Hilt, E. Steckhan, *J. Chem. Soc.* **1993**, 1706–1707.

⁹¹ H. C. Lo, C. Leiva, O. Buriez, J. B. Kerr, M. M. Olmstead, R. H. Fish, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6705–6716.

avant l'apparition d'un hydruure de rhodium à partir du formate formant le dioxyde de carbone puis transfert de cet hydruure sur le groupe pyridinium du NAD^+ pour former le NADH.

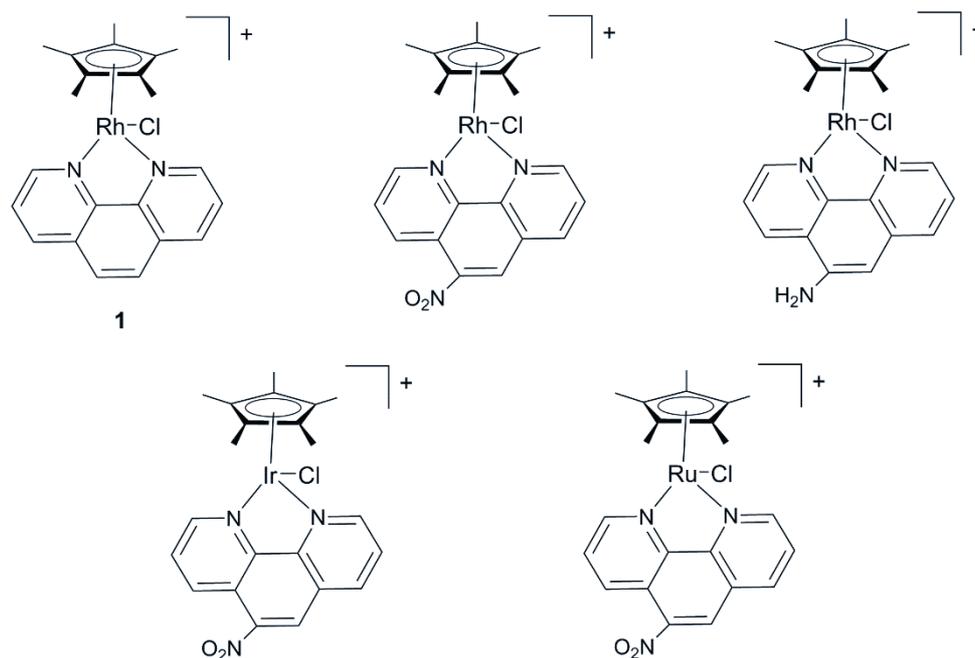


Figure 42 Complexe organométallique étudié par Canivet *et coll.* pour la régénération de NADH

La substitution par un groupement amino n'a pas d'influence électronique significative alors que le groupement nitro est impliqué dans des réductions à un électron rendant le ligand non-innocent et modifiant les potentiels redox des complexes correspondants.

Après avoir sélectionné un complexe de rhodium démontrant la meilleure activité (complexe **1** de la Figure 42) pour la production de NADH à partir de NAD^+ parmi les complexes étudiés, les auteurs l'ont mis en œuvre en présence d'une transformation enzymatique. La réaction chémoenzymatique sélectionnée est l'hydrogénation d'une cétone en un alcool secondaire à l'aide d'une alcool déshydrogénase avec régénération simultanée du NADH grâce au complexe de rhodium. La réaction hybride a un moins bon rendement que lorsque la réaction enzymatique seule est en excès de cofacteur (80% contre 62%). Notons qu'en conditions hybrides la cétone est introduite avec une concentration initiale de 33 mM en présence de 1 mM de NADH et de 0,5 mM de complexe : un rendement de 62% implique une utilisation nette de 20,46 mM de NADH. Cela montre que le complexe a été en mesure de régénérer près de vingt fois le cofacteur dans les conditions opératoires de l'enzyme. De plus, le complexe n'a pas inhibé l'enzyme. Du point de vue purement expérimental, précisons que dans ces travaux, la caractérisation de la régénération de cofacteur a été effectuée par spectroscopie UV-vis, le NADH présentant une bande d'adsorption caractéristique à 340 nm. En ce qui concerne la réaction chémoenzymatique, l'alcool produit est extrait au

diéthyléther avant d'être séparé puis identifié et quantifié par HPLC. La dimension analytique était donc ici relativement simple pour ce système catalytique sophistiqué.

Nous pouvons ici également revenir sur les travaux de Richard Fish *et coll.* qui présentent la régénération *in situ* de modèles de cofacteurs montrant la versatilité de la régénération organométallique pour une grande variabilité de cofacteurs, ce qui n'est pas le cas des systèmes enzymatiques très peu adaptables de par la reconnaissance spécifique clé/serrure entre l'enzyme et le cofacteur.⁹² Une nouvelle fois, ce complexe de rhodium exploite l'ion formiate comme donneur d'hydrogène. L'oxydation régiosélective du 2-hydroxybiphényl par hydroxylation en catéchol correspondant est catalysée par l'enzyme 2-hydroxybiphényl 3-monooxygénase (HbpA) de *Pseudomonas Azelaica HBP1*. Le cofacteur naturel NADH est remplacé par un cofacteur biomimétique *N*-benzyl-1,4-dihydropyridine. Néanmoins, une désactivation du système par une possible interaction entre des résidus aminés et thiolés avec le complexe de rhodium a été observée. La protection de ces fonctions $-NH_2$ et $-SH$ a permis la mise au point d'un système de régénération stable et productif.

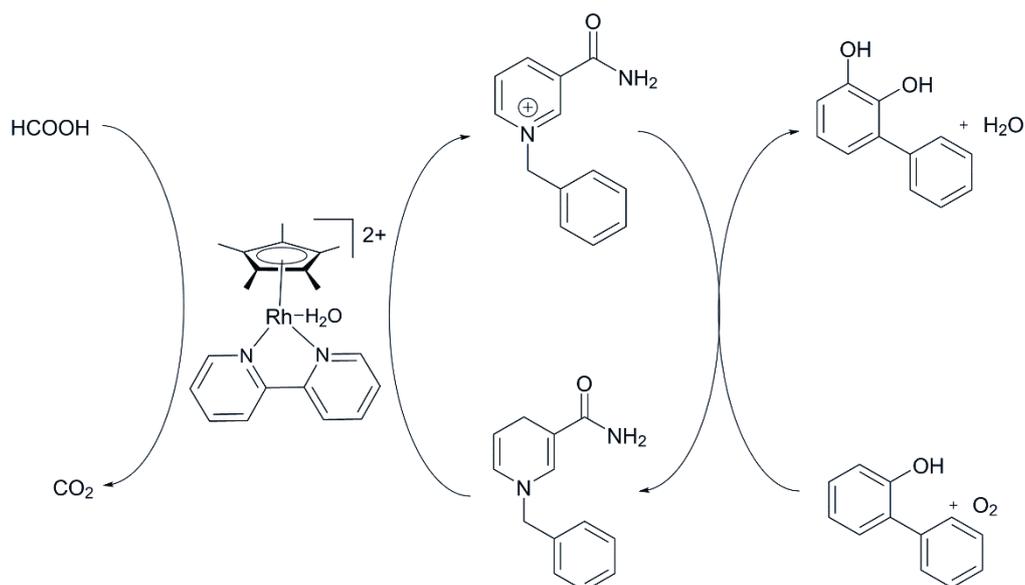


Figure 43 Catalyse hybride d'oxydation de phénol en catéchol avec régénération organométallique du biomime de cofacteur

On peut donc voir que ce type de complexe organométallique est compatible avec une réaction enzymatique de type hydrogénation/déshydrogénation.

⁹² J. Lutz, F. Hollmann, A. Schnyder, R. H. Fish, A. Schmid *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4783-4790.

3. Régénération du NAD^+ : exemple par mécanisme oxydatif

Le seul exemple de régénération de NAD^+ couplé à une réaction d'oxydation enzymatique en catalyse hybride est décrit par l'équipe de Gröger⁹³ avec des complexes de porphyrine de fer sulfonée (Figure 44). Cette équipe a testé différentes porphyrines mais une seule montre une réelle activité pour la régénération de NAD^+ . L'agent oxydant utilisé est le dioxygène de l'air dissous dans l'eau.

La régénération a été mise en œuvre *in situ* avec deux réactions enzymatiques différentes : d'une part la transformation du glucose en acide gluconique avec la glucose déshydrogénase de la bactérie *Bacillus sp.* en présence de sel de sodium ; et d'autre part la transformation de cyclooctanol en cyclooctanone à l'aide d'une alcool déshydrogénase.

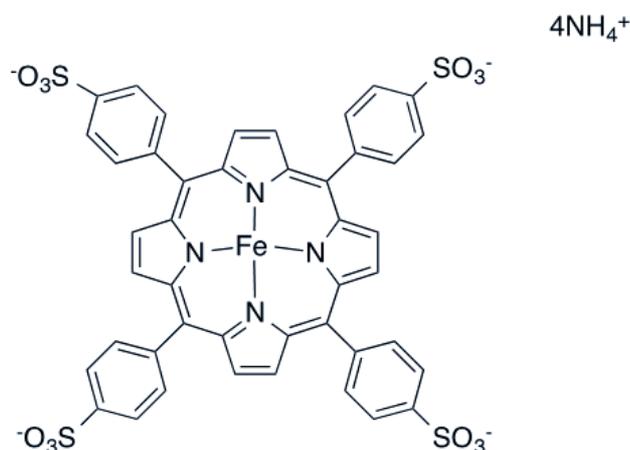


Figure 44 Tétraphénylporphyrine de fer sulfonée

L'activité de régénération de la porphyrine est de $0,11 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à température ambiante dans de l'eau distillée tamponnée à pH 7. La porphyrine montre de bonnes performances, mais, de manière surprenante, la méthode d'identification du NAD^+ n'est pas précisée dans l'article. Elle devrait classiquement se faire par analyse UV-vis mais la coloration de la porphyrine empêche toute caractérisation spectroscopique par superposition de bandes. Cet exemple reste un exemple isolé de régénération de NAD^+ par mécanisme oxydatif (Figure 45).

⁹³ H. Maid, P. Böhm, S. M. Huber, W. Bauer, W. Hummel, N. Jux, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 2397–2400.

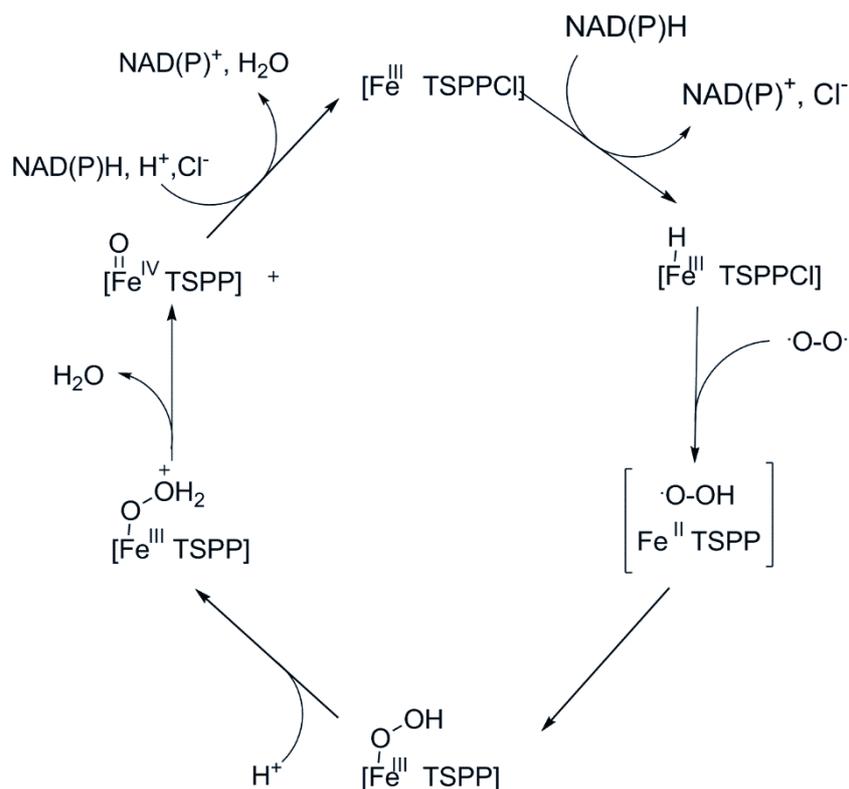


Figure 45 Proposition de mécanisme oxydatif de régénération de NAD⁺ selon Gröger *et coll.*

Le mécanisme de régénération proposé n'est malheureusement validé par aucune caractérisation, restant ainsi très spéculatif.

En dehors de ces deux mécanismes, on peut noter la régénération stœchiométrique d'un modèle de NADH par un complexe organométallique à base de fer [Fe₃(CO)₁₂]⁹⁴ qui a été décrite par l'équipe de M. Beller même si la réaction n'a pas été testée sur substrat réel (NADH). De plus, les conditions semblent peu adaptées à une régénération de cofacteur en conditions de réaction enzymatique. En effet, la réaction a lieu à 65°C dans du toluène et les rendements sont augmentés en présence de triflate de fer(II), Fe(OTf)₂, poison pour les enzymes à des concentrations trop élevées. Dans cet exemple, la concentration est de 35%mol. par rapport au modèle de NADH ce qui nous laisse penser que l'enzyme sera inhibée par le triflate de fer à ces concentrations.

⁹⁴ L. Q. Lu, Y. Li, K. Junge, M. Beller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52, 8382–8386.

IV Choix du système d'étude et méthodologie de thèse

Au regard de la bibliographie, nous avons montré l'intérêt grandissant d'une combinaison de la catalyse biologique et de la catalyse chimique, et notamment pour la valorisation de composés fonctionnels issus de la biomasse. L'utilisation de la catalyse chimique peut permettre de lever des verrous inhérents à la catalyse biologique, ici enzymatique, avec d'une part la décomposition du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 inhibiteur d'enzymes et d'autre part la régénération de cofacteur en déclinaison du concept de catalyse hybride avec une mise en œuvre one-pot/one-step.

Nous n'avons pas fait le choix dans les présents travaux d'étudier la décomposition du peroxyde d'hydrogène car cette réaction a déjà été largement étudiée et concerne un panel limité d'enzymes. On notera tout de même qu'un regain d'intérêt est prévisible concernant la réaction Cetus pour décomposer le peroxyde d'hydrogène formé qui limite la production de fructose, intermédiaire de choix pour la formation de 5-HMF.

Les enzymes de la famille des oxydoréductases ont la capacité de transformer sélectivement des charges biosourcées en molécules plateformes ou en molécules à haute valeur ajoutée. Ces oxydoréductases ont cependant l'inconvénient majeur d'avoir besoin d'un cofacteur qu'elles réduisent ou oxydent en fonction du substrat présent dans le milieu réactionnel. Ce cofacteur est donc modifié stœchiométriquement par la réaction enzymatique, ce qui engendre un coût élevé lorsque l'on envisage une transposition de ce procédé enzymatique sans régénération à l'échelle industrielle (dans une optique « bioraffinerie »). Des méthodes de régénération de cofacteur sont aujourd'hui étudiées et les résultats mettent en avant l'efficacité des complexes organométalliques tant dans la régénération du cofacteur que dans le respect des principes de chimie verte permettant de diminuer les coûts énergétiques de séparation par exemple. Des études de régénération chimique de NADH ont été rapportées dans la littérature, mais peu d'exemples ont été publiés concernant la régénération du NAD^+ . La catalyse chimique développée pour la régénération chimique de ces cofacteurs s'est concentrée sur des complexes organométalliques principalement à base de rhodium et d'iridium. Cependant, des études mécanistiques précises des modes d'action de régénération mis en jeu manquent encore pour bien cerner les paramètres critiques des réactions et optimiser les systèmes. Parmi les complexes les plus prometteurs, une porphyrine de fer et un complexe organométallique d'iridium ont démontré leur capacité pour régénérer le cofacteur NAD^+ en l'absence de toute autre molécule organique. Cependant, il s'agit d'une étude préliminaire et un travail d'amélioration du procédé chémoenzymatique comprenant un criblage vers des complexes

plus performants et sélectifs ainsi qu'une étude de compatibilité avec l'enzyme plus approfondie restent nécessaires.

Par ailleurs, on peut noter un nombre très important d'études autour de la réaction de conversion du glucose vers le 5-HMF. Cette molécule cible est en effet réputée très difficilement accessible à partir de glucose directement, et encore plus à partir de cellulose, ce qui représente un défi important.⁹⁵

Le verrou de cette réaction réside en l'isomérisation intermédiaire du glucose en fructose. Le fructose est en effet un intermédiaire chimique important pour la conversion du sucre en 5-HMF. Actuellement le fructose est synthétisé à partir de glucose par catalyse enzymatique, à l'aide d'une xylose isomérase, mais cette famille d'enzymes possède comme principale spécificité d'imposer un équilibre entre les deux isomères (1:1) engendrant des purifications successives par adsorption/désorption afin de tirer la réaction vers l'obtention de fructose et obtenir des rendements finaux de conversion en fructose de l'ordre de 90%. Ces étapes de purifications sont extrêmement coûteuses, ce qui limite l'intérêt de ces réactions enzymatiques à l'équilibre pour la production de synthons chimiques de haute valeur ajoutée.

Plusieurs alternatives sont proposées pour obtenir le fructose, des voies indirectes et des voies directes dont les deux suivantes :

- L'utilisation d'un système biphasique avec un transporteur boré pour extraire le fructose synthétisé par l'enzyme glucose isomérase ;
- la réaction de Cetus avec le passage par le glucosone.

Une voie indirecte étudiée que nous proposons de regarder dans ces travaux de thèse est la synthèse du fructose à partir de composés accessibles industriellement en envisageant une charge glucose ou cellulose. Parmi ces composés d'intérêt, nous avons retenu le sorbitol et son isomère, le mannitol, deux polyols C6 produits industriellement à partir de glucose 1G. Le sorbitol est en effet produit à partir de glucose par un procédé développé par l'entreprise Roquette Frères.⁹⁶ Ces deux polyols peuvent également être accessibles directement à partir de cellulose, mais avec des sélectivités détériorées.⁹⁷ Les deux enzymes retenues appartiennent à la famille des alcools déshydrogénases et nous avons donc tenté de les coupler avec un système de régénération *in situ* du cofacteur par une porphyrine de fer et un complexe d'iridium préalablement identifiés dans la littérature pour

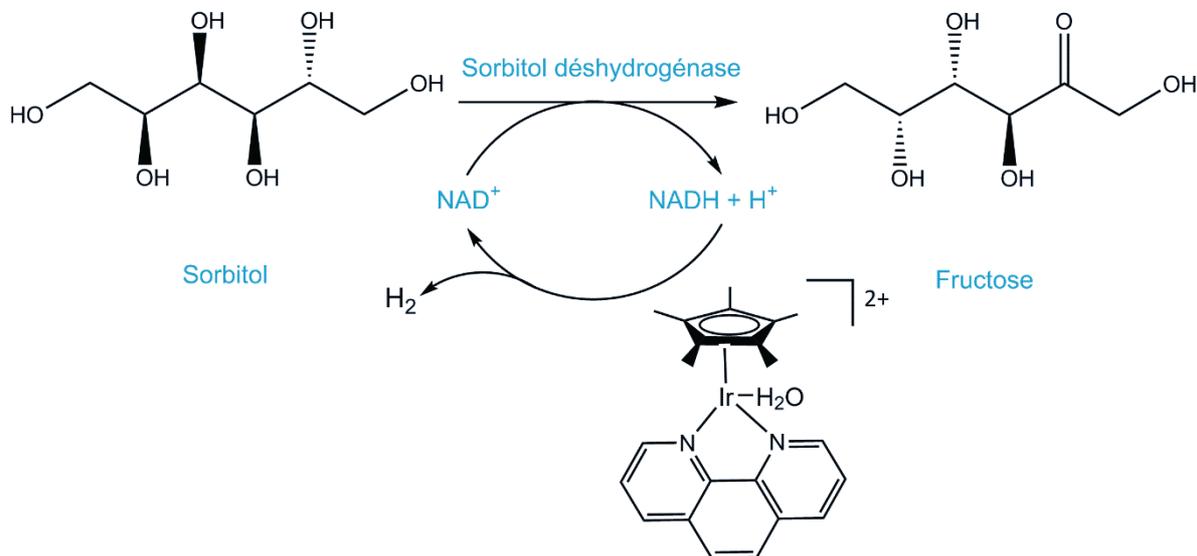
⁹⁵ A. A. Rosatella, S. P. Simeonov, R. F. M. Fradea, C. A. M. Afonso, *Green Chem.* **2011**, *13*, 754.

⁹⁶ Roquette Frères. Maltitol, sorbitol, mannitol, xylitol, isosorbide. at <<http://www.roquette.fr/polyols-sorbitol-xylitol-mannitol-maltitol-isosorbide/>>

⁹⁷ J. Xi, Y. Zhang, Q. Xia, X. Liu, J. Ren, G. Lu, Y. Wang, *Appl. Catal. A Gen.* **2013**, *459*, 52–58.

transformer sélectivement le sorbitol en fructose. Expérimentalement, le choix du catalyseur chimique s'est vite orienté vers un complexe iridium de référence [Cp*Ir(phen)(H₂O)](Figure 46)

à partir du sorbitol :



à partir du mannitol :

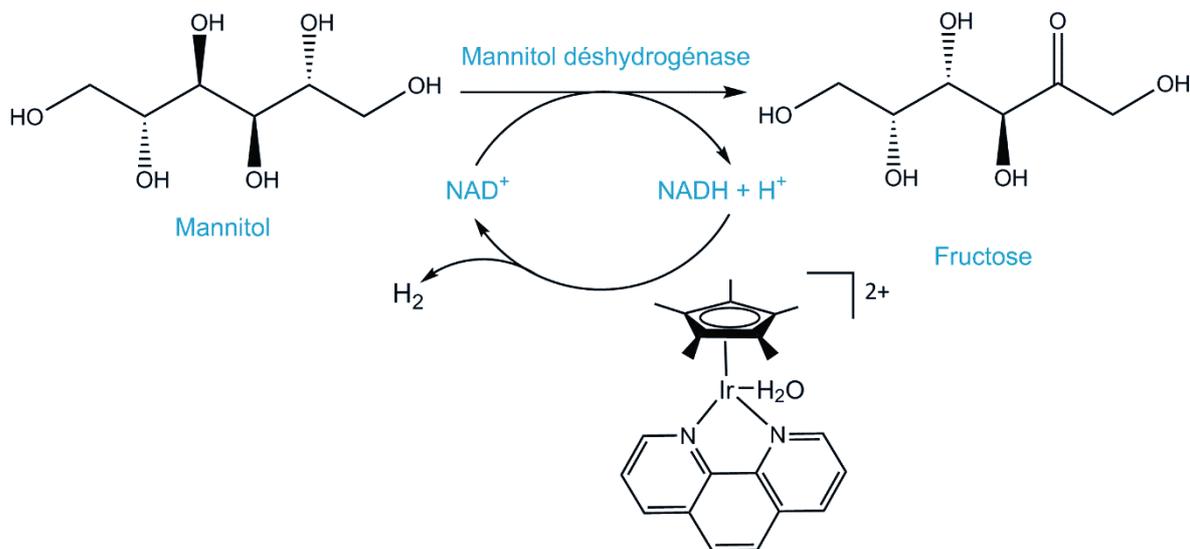


Figure 46 Réactions hybrides étudiées dans la présente thèse avec un complexe d'iridium

Méthodologiquement, pour conduire cette étude, nous avons dans un premier temps parfaitement caractérisé l'activité enzymatique et chimique de manière séparée pour identifier les conditions optimales de fonctionnement de chacun.

Les enzymes sorbitol et mannitol déshydrogénases sont caractérisées et leurs mises en œuvre sont décrites dans le chapitre 2.

L'activité de régénération de NAD^+ par le complexe de référence $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]$ est décrite dans le chapitre 3. Pour identifier les paramètres critiques de la réaction de régénération, l'étude expérimentale a été menée de concert avec une étude théorique DFT.

Pour améliorer l'activité de régénération organométallique suite aux résultats expérimentaux et théoriques décrits dans le chapitre 3, nous avons élargi la gamme de complexes d'iridium en substituant de manière ciblée le ligand phénantroline. Ces nouveaux complexes ont été hiérarchisés expérimentalement et comparés sur la base de modélisations théoriques.

La mise en œuvre en catalyse hybride est finalement détaillée dans le chapitre 5 de ce manuscrit. Des limitations de compatibilité et d'activité optimales sont mises en évidence puis des améliorations méthodologiques sont évaluées pour permettre d'augmenter le rendement en fructose à partir de sorbitol. De productivité moyenne, des perspectives sont proposées pour rendre le système de régénération in-situ par catalyse hybride plus productifs avec des approches moins conventionnelles de fonctionnalisations de cofacteurs.

Explicités ici avec la conversion de sorbitol en fructose, il faut noter que les travaux réalisés sur ce système pourraient servir la valorisation de nombreuses charges polyols (autres sucres alcools) avec notamment le glycérol pour obtenir respectivement des cétooses rares ou la dihydroxyacétone.

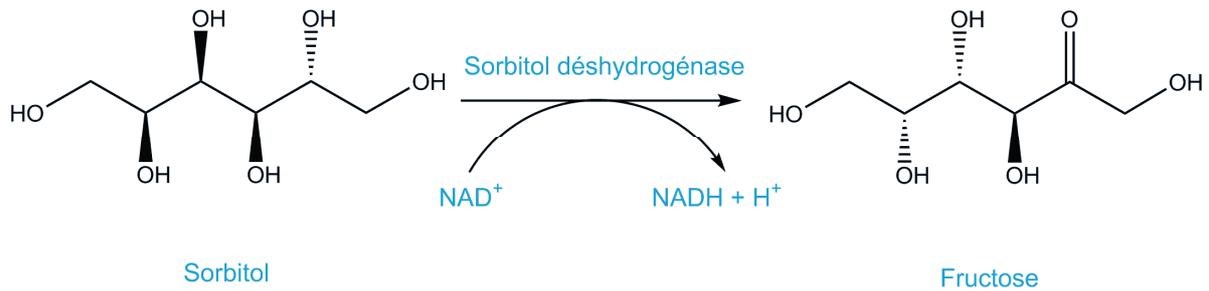
Chapitre 2 Étude des transformations enzymatiques

Introduction

Afin d'étudier la compatibilité entre une enzyme et un complexe organométallique, il est nécessaire de disposer d'enzymes modèles nous permettant de maîtriser l'activité enzymatique du système hybride. Il faut ensuite définir les conditions opératoires dans lesquelles le biocatalyseur peut fonctionner. En effet, dans le cas d'une catalyse hybride, parmi les exemples décrits dans la littérature, c'est le catalyseur enzymatique qui semble avoir la fourchette d'activité optimale la plus étroite. Les enzymes du type déshydrogénases comme celles choisies pour notre étude sont en fait capables de catalyser non seulement des réactions de déshydrogénation mais également des réactions inverse d'hydrogénation dans des fourchettes de pH parfois proches. En tant que catalyseur biologique, la gamme de température de travail est souvent proche de la température ambiante et des températures trop basses ou trop hautes peuvent inactiver l'enzyme, parfois de manière irréversible. C'est donc le catalyseur chimique qui va devoir « s'adapter » aux gammes opératoires du biocatalyseur à savoir non seulement le pH, mais aussi la température et les composés présents dans le milieu (sel, tampon, solvant)

Les deux systèmes enzymatiques étudiés au cours de cette thèse sont décrits Figure 1.

à partir du sorbitol :



à partir du mannitol :

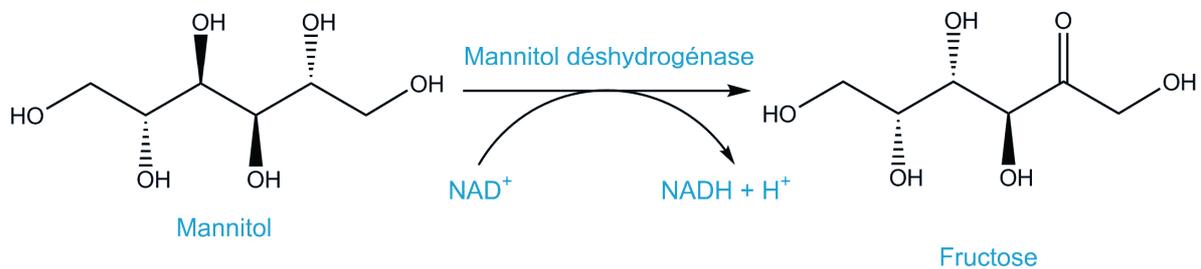


Figure 1 Réactions enzymatiques modèles étudiées

Les deux réactions enzymatiques sont la déshydrogénation sélective d'un polyol accompagnée de la réduction du cofacteur NAD⁺ en NADH puis la libération d'un proton menant à la production de fructose.

Après quelques définitions, dans ce chapitre, nous argumenterons le choix des deux réactions enzymatiques modèles et recenserons les données disponibles dans la littérature pour les enzymes retenues. Ensuite, la caractérisation des lots d'enzymes commerciales utilisés sera présentée.

I Sélection des biocatalyseurs modèles

1. Définitions

Il existe au sein d'une cellule un large spectre de réactions catalytiques réalisées par des enzymes et pouvant se résumer par des transferts de groupements fonctionnels d'un métabolite à un autre. Pour réaliser l'ensemble de ces étapes, les cellules possèdent des intermédiaires leur permettant de transporter ces groupements d'un composé à un autre. En fonction des réactions, un cofacteur, molécule non protéique, peut-être nécessaire à l'activité catalytique. Il existe dans une cellule deux catégories de cofacteurs : 1) les ions métalliques qui permettent le maintien de la structure de l'enzyme et 2) les coenzymes. Les coenzymes sont par ailleurs classés selon le mode de liaison à l'enzyme. Un coenzyme lié par une liaison hydrogène ou une liaison ionique à l'enzyme sera appelé co-substrat, tandis que celui lié par une liaison covalente sera appelé groupement prosthétique.

Parmi les enzymes métaboliques, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux oxydoréductases qui représentent la première classe d'enzymes dans la nomenclature E.C. (Enzyme Commission numbers) classant les enzymes en fonction du type de réaction qu'elles réalisent. Cette classe regroupe des protéines complexes, souvent fonctionnelles une fois l'assemblage de plusieurs sous-unités (identiques ou non) réalisé.

Au sein de cette classe d'enzymes, les déshydrogénases sont des oxydoréductases utilisant comme cofacteur le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+). L'enzyme, en réalisant son action catalytique, déplace un électron et réduit le NAD^+ en NADH. Ces cofacteurs sont donc utilisés en quantités stœchiométriques pour permettre l'activité enzymatique. Comme nous l'avons montré dans le chapitre bibliographique, il existe un intérêt tout particulier à disposer d'un complexe organométallique capable de régénérer ce cofacteur. Afin de sélectionner une enzyme modèle pour évaluer ce couplage de catalyse, plusieurs critères de sélection doivent être pris en compte.

2 Critères de sélections des enzymes

Comme suggéré dans le chapitre bibliographique, la compatibilité entre l'enzyme et le catalyseur chimique est la clé du succès de la combinaison hybride. Cette compatibilité doit être tant au niveau des conditions opératoires de chacune des réactions qu'au niveau des catalyseurs entre eux. L'une des spécificités de ces travaux de thèse a consisté à prendre en compte l'ensemble des contraintes techniques liées autant à la catalyse enzymatique qu'à la catalyse chimique.

En préambule aux essais expérimentaux, il était donc important de sélectionner des alcools déshydrogénases relativement bien étudiées. Par ailleurs, désirant à travers ce projet démontrer *a minima* une certaine compatibilité, il était nécessaire de pouvoir disposer d'une préparation enzymatique possédant une activité stable et des performances homogènes entre chaque lot d'enzymes. C'est pour ces raisons que l'utilisation de lots d'enzymes commerciales que l'on a considéré comme pures a été privilégiée pour démontrer le concept de catalyse hybride.

La classe d'enzymes des alcools déshydrogénases est l'une des plus larges et inclut des enzymes ayant des structures et, par conséquent, des mécanismes catalytiques très différents. On peut classer ces enzymes en trois sous-familles selon la longueur de leurs chaînes polypeptidiques :

- courte (SDR Short-chain dehydrogenase/reductases \approx 250 acides aminés) ;
- moyenne (MDR Medium-chain dehydrogenase/reductases \approx 350 acides aminés) ;
- longue (LDR Long-chain dehydrogenase \approx 360-550 acides aminés).¹

Par ailleurs, les alcools déshydrogénases sont des enzymes de type michaeliennes, c'est-à-dire que l'enzyme et le substrat forment un intermédiaire enzyme-substrat avant que la réaction catalytique ne se produise. Une fois l'action catalytique réalisée, l'enzyme et le produit se dissocient. L'activité des enzymes michaeliennes est caractérisée par deux principaux paramètres : la vitesse maximale de l'enzyme (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_m). La vitesse maximale est obtenue à saturation de l'enzyme, autrement dit lorsque tous les sites actifs de toutes les molécules d'enzymes sont occupés. Sa valeur dépend également d'autres conditions expérimentales (température, pH, etc.). La constante de Michaelis représente la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de V_{max} . Ces deux paramètres permettent de décrire la cinétique de la réaction catalysée et de comparer la capacité de plusieurs enzymes à (dés)hydrogéner un substrat donné. Ces valeurs peuvent donc servir également de base pour évaluer l'impact de la régénération de cofacteur avec un complexe organométallique.

Au regard de cette étude bibliographique, deux alcool déshydrogénases semblaient intéressantes comme modèles : la sorbitol déshydrogénase et la mannitol déshydrogénase.

3 Première enzyme modèle : Sorbitol déshydrogénase

La sorbitol déshydrogénase (SDH) est une protéine fonctionnelle utilisant uniquement le NAD^+ comme cofacteur pour catalyser l'oxydation du sorbitol en fructose décrite Figure 2.

¹ Klimacek, M.; Kavanagh, K. L.; Wilson, D. K.; Nidetzky, B. *Chem. Biol. Interact.* **2003**, 143-144, 559–582.

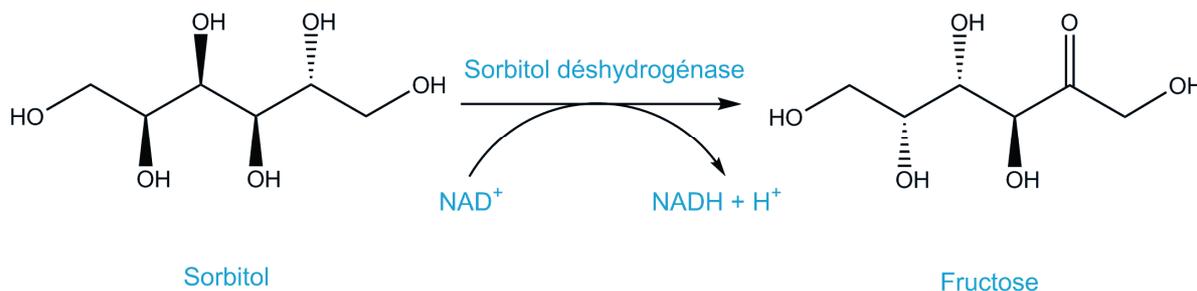


Figure 2 Réaction catalysée par l'enzyme sorbitol déshydrogénase

La SDH fait partie de la famille des MDR avec une taille de 38 kDa. Plusieurs structures ont déjà été décrites pour les SDH de rat, d'homme ou de mouton.² Cette enzyme se présente sous la forme d'un homotétramère associé à un atome de zinc. Elle possède donc une fois assemblée quatre sous-unités, chacune possédant un site catalytique intégrant un atome de zinc non fonctionnel à l'état monomérique. Pour former des sites catalytiques fonctionnels, les quatre sous-unités doivent se complexer selon un ordre décrit Figure 3.

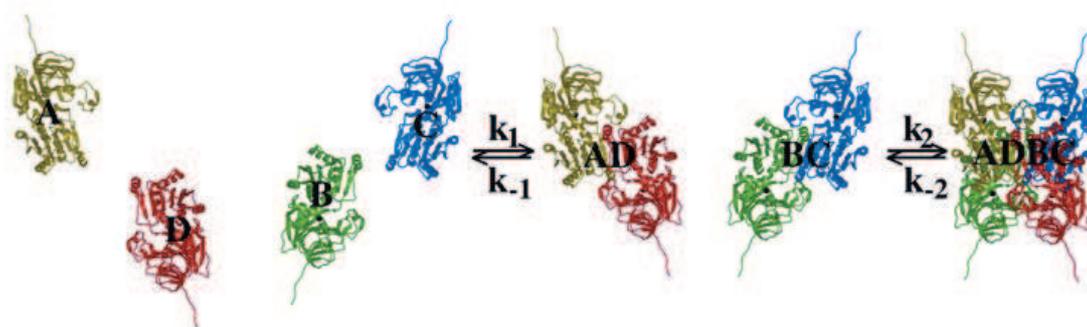


Figure 3 Complexation des sous-unités de l'enzyme sorbitol déshydrogénase selon Helgren *et coll*³.

Ces sous-unités se complexent d'abord deux à deux puis les deux dimères se complexent entre eux. Les études afférentes ont aussi permis de déterminer l'environnement du site actif comme le montre la Figure 4. L'atome de zinc est entouré de 3 acides aminés (cystéine, glutamate et histidine) et d'une molécule d'eau.

² Lindstad, R. I.; Teigen, K.; Skjeldal, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, 435 (2), 202–208.

³ Helgren, M.; Kaiser, C.; De Haij, S.; Norberg, Å.; Höög, J. O. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, 64 (23), 3129–3138.

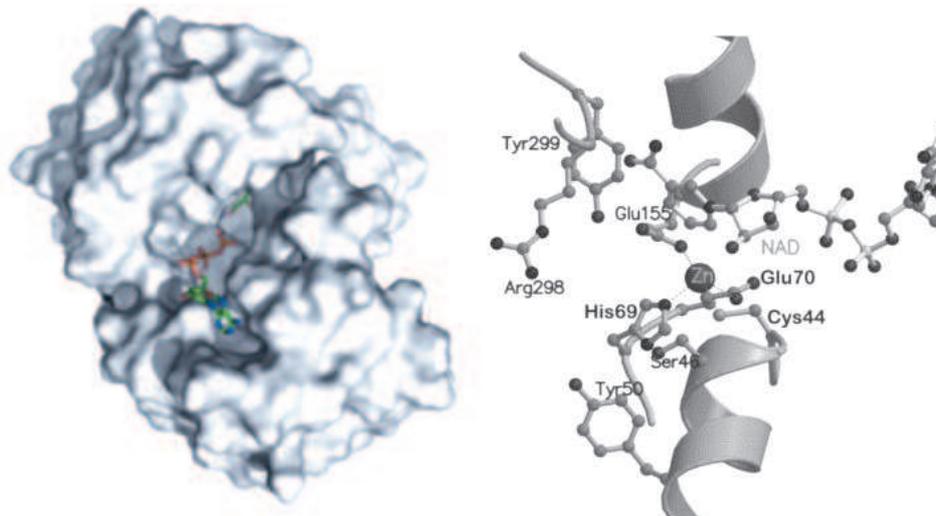


Figure 4 A) Vue d'ensemble⁴ et B) coordination de l'atome de zinc au sein de la poche catalytique de la sorbitol déshydrogénase de foie de mouton⁵

Les propriétés biochimiques de la sorbitol déshydrogénase (EC 1.1.1.14) ont été étudiées par Smith. Cette enzyme présente une bonne stabilité ainsi qu'une activité homogène pour la conversion de sorbitol en fructose en présence du cofacteur NAD⁺.⁶ Cette enzyme extraite de foie de mouton est disponible chez Sigma Aldrich.

Les paramètres cinétiques obtenus pour la SDH de foie de mouton sont décrits Tableau 1. On peut constater que l'oxydation du sorbitol est favorisée à pH basique avec une V_{max} de 33 s⁻¹ à pH 9,9 contre 19,6 s⁻¹ à pH 7,4. La valeur de K_m est de 1,8 mM.

Tableau 1 Paramètres cinétiques de la sorbitol déshydrogénase de foie de mouton à deux pH différents pour divers polyols caractérisés par Lindstad *et coll.*⁷ Conditions opératoires : température 23.5°C, [NAD] = 940 μM, [tampon] = 50mM.

Substrate	Value at pH 7.4 of			Value at pH 9.9 of		
	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m	V_{max}	K_m	V_{max}/K_m
	s ⁻¹	mM	s ⁻¹ · mM ⁻¹	s ⁻¹	mM	s ⁻¹ · mM ⁻¹
Sorbitol	19.6	3.6	5.4	33	1.8	18.3
Xylitol	18.2	0.90	20.2	29.4	0.70	42
L-Iditol	20.4	3.3	6.2	35.5	2.5	14.2
Ribitol	20	51	0.39	29.4	5.6	5.3
D-Mannitol	18.2	145	0.13	33	95	0.35
Galactitol	20	680	0.029	28.6	285	0.10

Le mode de conservation des enzymes a été adapté en fonction des observations de la littérature. Ainsi, l'enzyme est solubilisée puis divisée dans des eppendorfs® (aliquotée) puis conservée à -20°C.⁸

⁴ Lindstad, R. I.; Teigen, K.; Skjeldal, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, 435 (2), 202–208.

⁵ Johansson, K.; El-Ahmad, M.; Kaiser, C.; Jörnvall, H.; Eklund, H.; Höög, J. O.; Ramaswamy, S. *Chem. Biol. Interact.* **2001**, 130-132, 351–358.

⁶ Smith, M. G. **1962**, 83 (1), 135–144.

⁷ Lindstad, R. I.; Hermansen, L. F.; McKinley-McKee, J. S. *Eur. J. Biochem.* **1992**, 210 (2), 641–647.

L'enzyme SDH est une bonne candidate pour notre étude mais pour maximiser nos chances de démontrer la faisabilité de notre catalyse hybride, une seconde alcool déshydrogénase a été sélectionnée du fait de sa différence de mécanisme réactionnel par rapport à la SDH.

4 Seconde enzyme modèle : Mannitol déshydrogénase

L'autre enzyme modèle de la thèse, la Mannitol déshydrogénase (MDH) (EC 1.1.1.67), est purifiée à partir de la souche bactérienne *Pseudomonas fluorescens*. Le lot qui a été retenu pour ces travaux est disponible commercialement chez le fournisseur Megazyme.

Cette enzyme appartient à la famille des LDR avec une taille de 54 kDa et a été classée dans une sous-famille spécifique les *polyol-specific long-chain dehydrogenases/reductases (PSLDRs)*.⁹ Elle catalyse l'oxydation du mannitol en fructose décrite Figure 5.

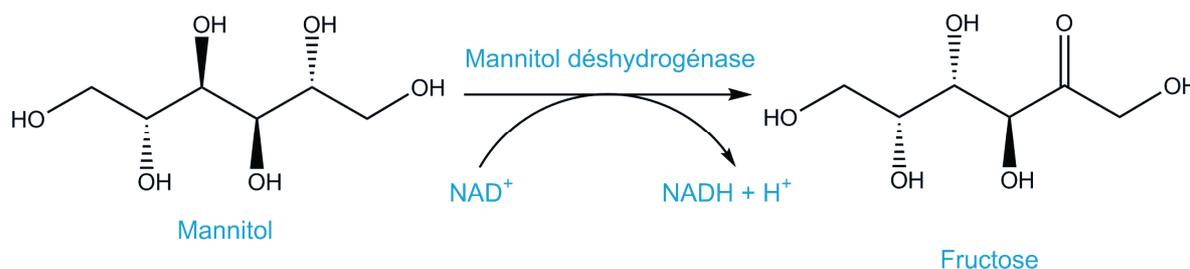


Figure 5 Réaction catalysée par l'enzyme mannitol déshydrogénase

La famille des PSLDR a été largement étudiée, et des parallèles entre les structures des différentes enzymes ont pu être établis. Un arbre phylogénétique Figure 6 permet ainsi d'apprécier l'étendue des sous-familles.

⁸ Jeffery, J.; Cummins, L.; Carlquist, M.; Jornvall, H. *Eur J Biochem* **1981**, *120* (2), 229–234.

⁹ Klimacek, M.; Nidetzky, B. *Society* **2002**, *18*, 13–18.

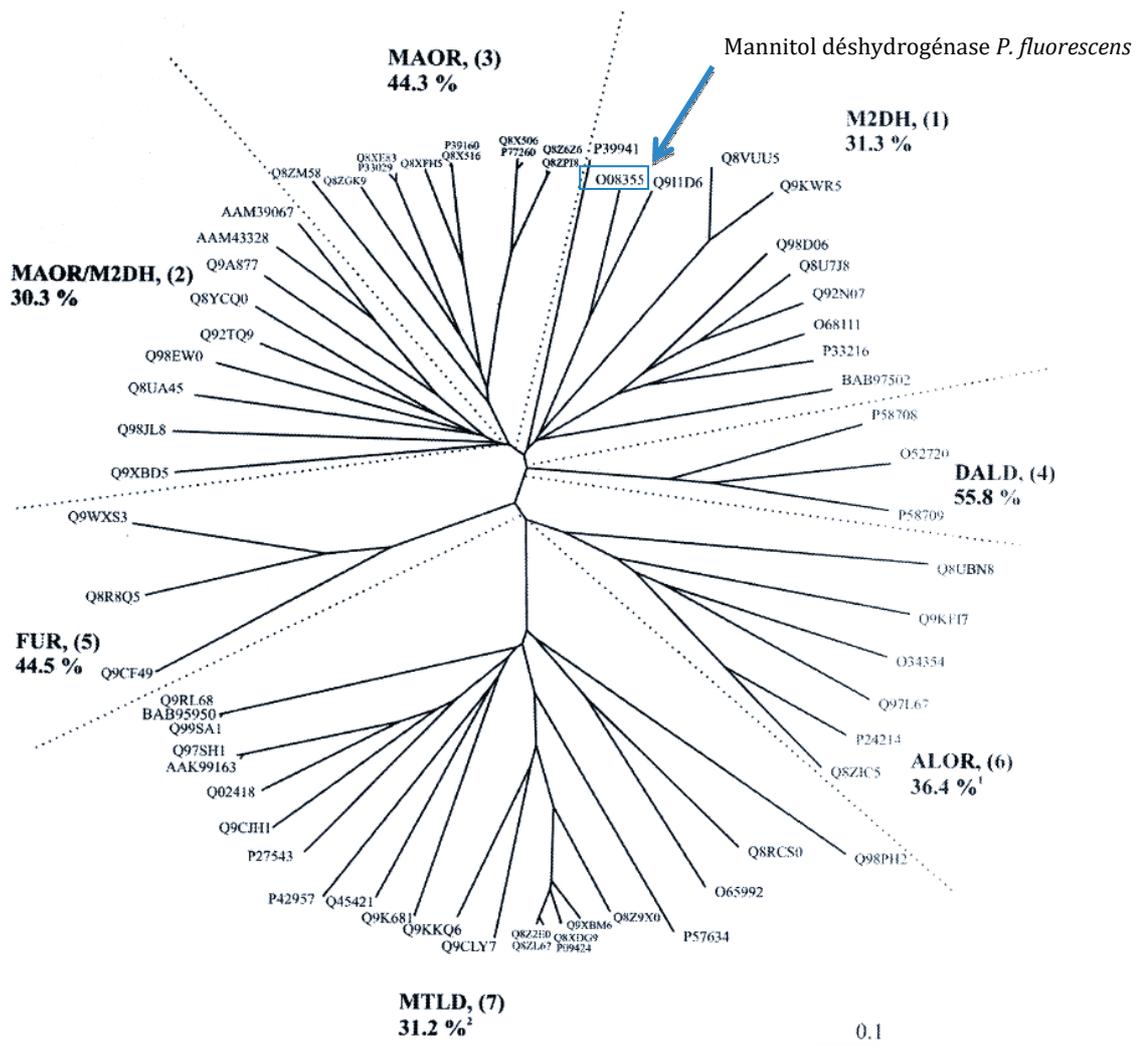


Figure 6 Arbre phylogénétique de la famille des PSLDR avec le pourcentage d'acides aminés identiques entre les clusters¹⁰

Ceci souligne le fait qu'il existe une variété importante de mannitol déshydrogénases (11 M2DH dans la Figure 7), et illustre toute la difficulté à choisir une enzyme modèle. Dans le cas où les paramètres cinétiques et opératoires propres à l'enzyme sélectionnée ne sont pas optimaux pour notre système, il sera toujours possible d'étudier une autre enzyme de cette classe.

La structure de la MDH *P. fluorescens* que nous avons utilisée a été largement détaillée. Une analyse précise de son mécanisme réactionnel¹¹ nous permet de bien décrire le type d'interactions entre les acides aminés du site catalytique de l'enzyme, son cofacteur et le substrat (Figure 7).

¹⁰ Klimacek, M.; Kavanagh, K. L.; Wilson, D. K.; Nidetzky, B. *Chem. Biol. Interact.* **2003**, 143-144, 559–582.

¹¹ Kavanagh, K. L.; Klimacek, M.; Nidetzky, B.; Wilson, D. K. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (45), 43433–43442.

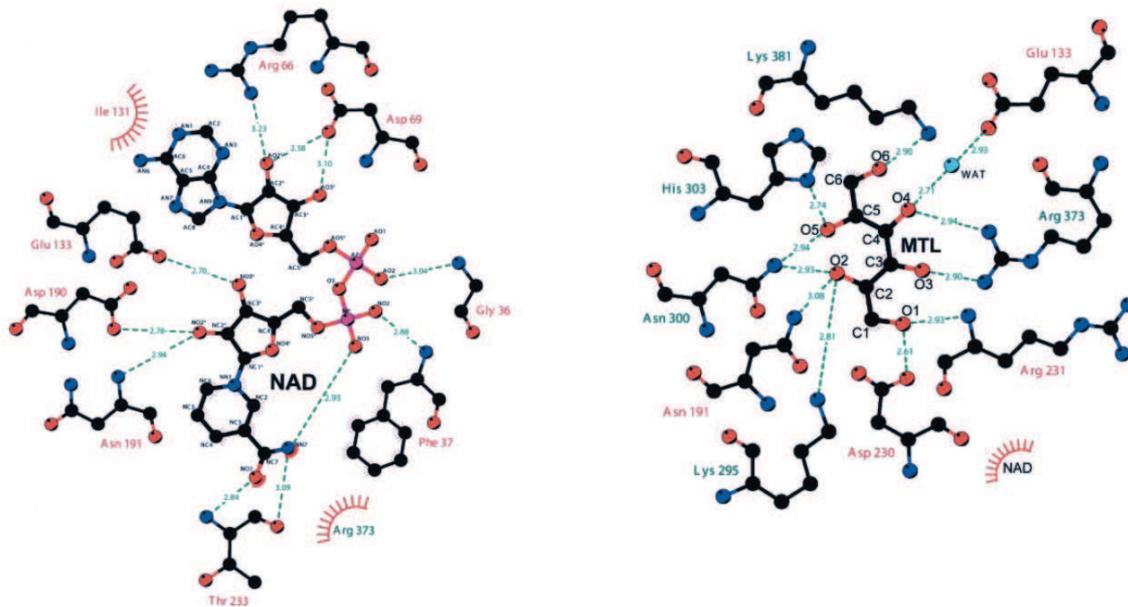


Figure 7 Interactions entre l'enzyme et le cofacteur NAD (à gauche) et entre le substrat et l'enzyme (à droite)¹²

Cette enzyme possède un mode de fonctionnement différent de celui de la SDH car elle ne complexe pas d'ion métallique au sein de son site actif. En effet, la réaction s'effectue une fois le substrat stabilisé au sein du site actif de l'enzyme par la présence du cofacteur. Leur proximité permet ensuite le transfert d'hydrogène et la libération d'un proton.

Klimacek *et coll.* ont également mené une large étude sur la biochimie de cette enzyme, montrant une activité stable en présence du cofacteur NAD⁺. Les constantes cinétiques sont détaillées dans une publication du journal *Biochemistry* de 2002¹³, et dont les résultats sont rapportés Tableau 2.

¹² Kavanagh, K. L.; Klimacek, M.; Nidetzky, B.; Wilson, D. K. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (45), 43433–43442.

¹³ Klimacek, M.; Nidetzky, B. **2002**, 41 (31), 10158–10165.

Tableau 2 Paramètres cinétiques de la mannitol déshydrogénase *P. fluorescens*.

Conditions opératoires : température 25°C, pH 10, [tampon glycine] = 50mM, [NAD] = 3mM

$k_{\text{cato}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	40 ± 0.5
$K_{\text{mannitol}} \text{ (mM)}$	0.40 ± 0.02
$k_{\text{cat}}/K_{\text{mannitol}} \text{ (M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}$	1.0×10^5
$K_{\text{NAD}^+} \text{ (}\mu\text{M)}$	93 ± 8
$k_{\text{cat}}/K_{\text{NAD}^+} \text{ (M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}$	4.0×10^5
$K_{\text{INAD}^+} \text{ (}\mu\text{M)}$	300 ± 50
$k_{\text{catr}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	20 ± 0.7
$K_{\text{fructose}} \text{ (mM)}^b$	0.44 ± 0.05
$k_{\text{cat}}/K_{\text{fructose}} \text{ (M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}^b$	4.5×10^4
$K_{\text{NADH}} \text{ (}\mu\text{M)}$	10 ± 2
$k_{\text{cat}}/K_{\text{NADH}} \text{ (M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}$	2.0×10^6
$K_{\text{INADH}} \text{ (}\mu\text{M)}$	30 ± 7
	100 ± 30^c
$K_{\text{eq}} \text{ (M)}$	2.2×10^{-9d}
	2.0×10^{-9e}

^a Kinetic parameters were obtained from nonlinear fits to eq 4, using initial velocities determined in the direction of D-mannitol oxidation (o) and fructose reduction (r) at pH 10.0. ^b Based on 1% free carbonyl form in aqueous solution. ^c Obtained from a linear competitive inhibition of NADH versus NAD⁺ and fits of data to eq 5. ^d Thermodynamic equilibrium constant, calculated by using the Haldane relationship for

La valeur de K_{cat} mentionnée dans ce tableau correspond à la constante catalytique de l'enzyme. Elle caractérise le nombre de moles de produit formées par seconde et par mole d'enzyme. Cette constante correspond donc à la vitesse maximale de l'enzyme (V_{max}) sur le nombre de moles d'enzyme. Le rapport $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ est souvent indiqué comme mesure de l'efficacité catalytique. Par ailleurs, dans ce tableau, on peut assimiler la valeur de K_{mannitol} à notre K_{m} . Ainsi, on peut en déduire que l'enzyme possède une bonne activité catalytique d'oxydation du mannitol à pH 10. De plus, l'enzyme MDH semble avoir une constante cinétique du même ordre de grandeur que celle de la SDH.

Après une étude approfondie de la littérature ayant permis de sélectionner ces deux enzymes, il est important d'évaluer le caractère réversible de l'activité catalytique de ces enzymes. Celui-ci est développé dans le paragraphe suivant.

5 Réversibilité des réactions

Pour démontrer le concept de catalyse hybride, nous avons donc retenu deux enzymes répondant à un certains nombres de critères et produisant *in fine* du fructose. Seul le substrat change, l'une convertissant préférentiellement le sorbitol et l'autre le mannitol. Ces deux enzymes sont dépendantes du cofacteur NAD⁺ pour réaliser la réaction d'intérêt. La présence d'un atome de zinc dans la poche catalytique de la SDH engendre cependant des mécanismes d'actions totalement différents entre ces deux enzymes.

Lors de l'analyse de la littérature, il est apparu que le rôle du pH sur l'activité des enzymes est primordial. En effet, en fonction du pH, l'enzyme réalise l'oxydation du polyol ou la réduction du fructose comme décrit Figure 8. Smith a publié l'effet du pH sur l'oxydation du sorbitol en fructose avec la SDH et Slatner *et coll.* l'effet du pH sur la réduction du fructose en mannitol avec la MDH.¹⁴

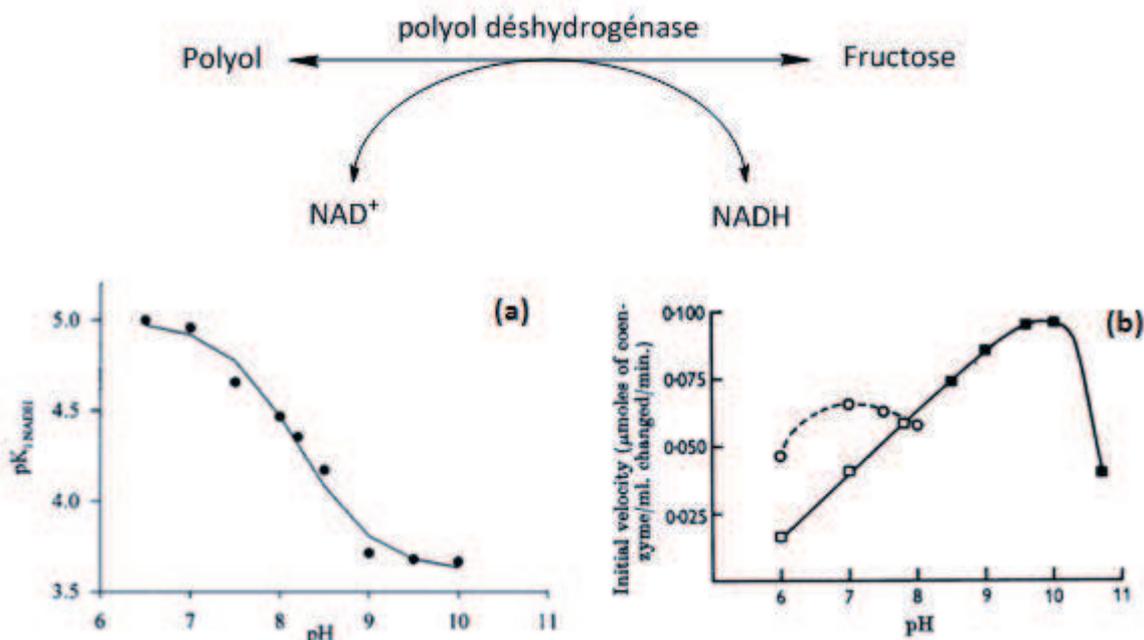


Figure 8 Réversibilité des réactions en fonction du pH (a) pour la réduction du fructose en mannitol et (b) pour l'oxydation du sorbitol (ligne pleine) et du fructose (ligne pointillée).

(a) le pK_{iNADH} est déterminé à partir de l'inhibition par rapport au lien fait entre le NAD^+ et la MDH pour l'oxydation du mannitol (b) les marques vides correspondent au tampon phosphate et les marques pleines au tampon glycine.

En l'absence de régénération de cofacteur, les variations d'activités en fonction du pH imposent de fixer le pH précisément afin d'assurer une production maximale de fructose.

Dans le cas d'une régénération totale du cofacteur $NADH$ en NAD^+ , l'enzyme est dans l'impossibilité d'effectuer la réaction inverse, c'est-à-dire du fructose vers le polyol. Cette indisponibilité du cofacteur réduit se produit dans le cas où la régénération du cofacteur est plus rapide que la réaction enzymatique et, dans ce cas, le fait d'être au pH optimal serait moins critique en système hybride. La catalyse chimique régénérant le cofacteur permettrait donc d'élargir la gamme de pH optimale.

Après avoir sélectionné les enzymes que nous utiliserons dans cette étude, il était important d'évaluer leurs activités respectives afin de déterminer les fenêtres d'utilisation pour les systèmes hybrides. Comme mentionné précédemment, ces analyses permettront aussi de comparer l'activité de l'enzyme en système hybride à l'activité de l'enzyme seule afin d'être en mesure d'identifier les

¹⁴ Slatner, M.; Nidetzky, B.; Kulbe, K. D. *Biochemistry* **1999**, *38* (32), 10489–10498.

éventuels effets indésirables (inhibitions, déstabilisations, etc.) liés à l'association des deux catalyses. Ces caractérisations sont traitées dans le paragraphe suivant.

II Caractérisations des réactions enzymatiques pour la production du fructose

1 Thermodynamique

Une enzyme permet de catalyser une réaction en diminuant la barrière énergétique de celle-ci comme montré Figure 9.

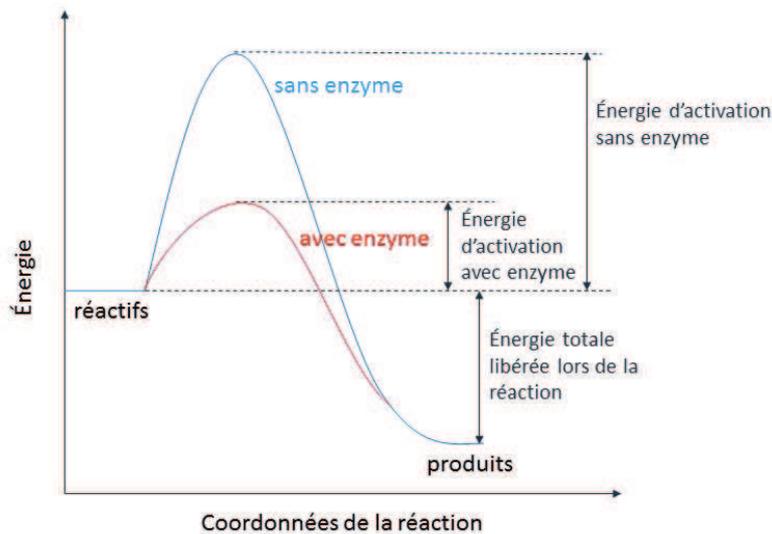


Figure 9 Effet de la catalyse enzymatique sur les coordonnées de réaction

La méthode « composants contributions » de Fleming *et coll.* est un modèle permettant d'estimer l'enthalpie libre standard (ΔrG°) de réactions issues du vivant en combinant deux méthodes déjà existantes : *group contributions* et *reactant contributions*. Cette méthode respecte bien évidemment les lois de la thermodynamique et peut s'appliquer aux réactions enzymatiques.¹⁵ Elle est d'une grande utilité car elle permet de montrer la faisabilité de certaines réactions mais aussi de disposer d'informations quant à la cinétique des réactions enzymatiques. En effet, lorsque ΔrG° est négatif, cela montre que la réaction est spontanée.

Cette méthode est utilisée par le site internet : <http://equilibrator.weizmann.ac.il/> développé par l'équipe de R. Milo pour simuler la variation de ΔrG° en fonction du pH pour différentes réactions enzymatiques. Les graphiques représentés Figure 10 et Figure 11 évaluent les réactions d'intérêt de production de fructose pour une force ionique de 0.35 M à l'aide de la méthode décrite ci-dessus. La force ionique de notre milieu est élevée à cause d'une forte concentration en solution tampon (150 mM).

¹⁵ Noor, E.; Haraldsdóttir, H. S.; Milo, R.; Fleming, R. M. T. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, 9 (7).

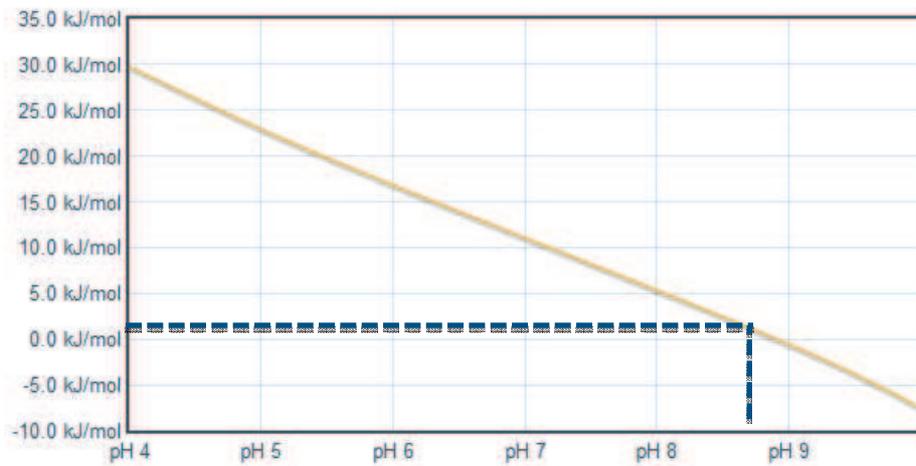


Figure 10 Énergie de formation du fructose à partir du sorbitol en fonction du pH avec une force ionique de 0,35 M

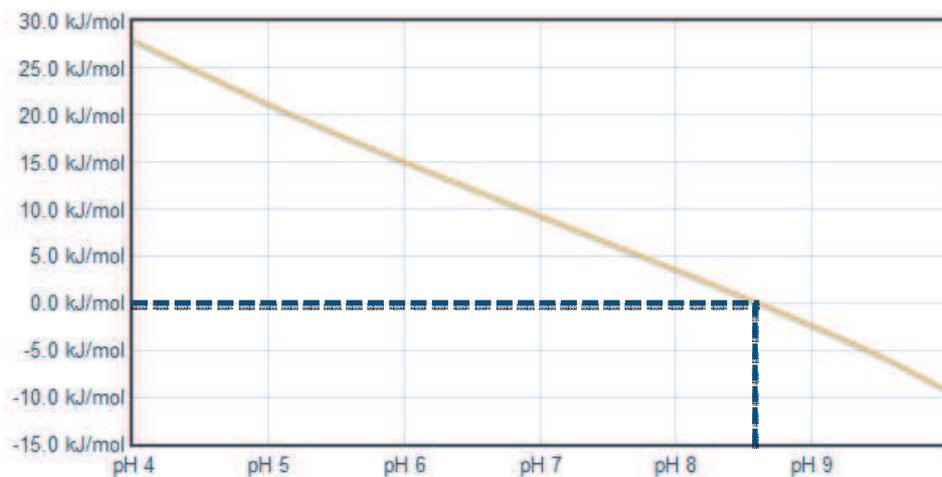


Figure 11 Énergie de formation du fructose à partir du mannitol en fonction du pH avec une force ionique de 0,35 M

Les deux réactions sont thermodynamiquement favorisées à pH basique, avec un léger déplacement pour la SDH vers des pH davantage basiques que la MDH. Ceci est en accord avec la littérature : Smith et Slatner *et coll.* montrent une activité des deux enzymes pour la production de fructose à des pH supérieurs à 6 pour la SDH et 8 pour la MDH.

2 Mise en œuvre des enzymes

Les deux composés enzymes et cofacteurs étant des molécules organiques, il est important de définir des conditions de conservation maintenant leur intégrité. Les lots commerciaux pour ce type d'enzymes sont en général assez « standardisés », mais il convient de vérifier l'activité à chaque utilisation d'un nouveau lot. Un autre point important concerne le taux de pureté et la stabilité des cofacteurs (présence de NAD^+ dans la solution stock de NADH et inversement) susceptible de biaiser l'interprétation des résultats si l'on n'y prend pas garde.

2.1 Validation des conditions opératoires

Comme mentionné précédemment, les enzymes sont des molécules dont l'activité est particulièrement sensible aux conditions opératoires. Les concentrations optimales pour l'enzyme SDH de foie de mouton ont été étudiées par Smith. L'enzyme utilisée pour nos tests étant similaire, nous nous affranchissons de tester les différentes concentrations de substrat et de cofacteur. Les conditions opératoires utilisées dans la littérature concernant la MDH sont semblables à celles de la SDH. Par conséquent, les conditions opératoires de tous les tests enzymatiques sont résumées Figure 12. L'unité « U » associée à l'enzyme se dit « unité » ; elle est définie comme la quantité d'enzyme permettant de convertir 1 μmol de substrat par minute.

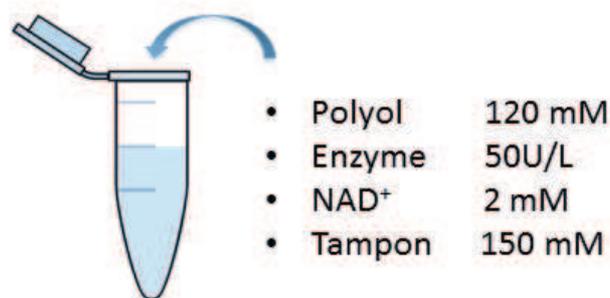


Figure 12 Conditions opératoires des tests enzymatiques

2.2 Contrôles

Afin de s'assurer de la stabilité du système et de l'absence de contamination du NADH en NAD^+ résiduel et inversement, des essais dits « blancs » ont été réalisés (Figure 13). La production de fructose a été suivie par chromatographie liquide et plus précisément par chromatographie ionique (HPLiC). Cet outil est en effet plus adapté pour ce type d'analyse par rapport à l'HPLC car il permet de détecter des sucres à l'état de traces. Le principe de l'HPLiC est l'ionisation des composés avant leur séparation par la colonne à l'aide d'une phase mobile basique. Le détecteur mesure la conductivité

de la solution en fin de colonne. La limite de détection du fructose est en effet de 10 mg/L pour l'HPLiC et de 500 mg/L pour l'HPLC. La production de NADH a été suivie par spectrométrie UV-vis (à 340 nm).

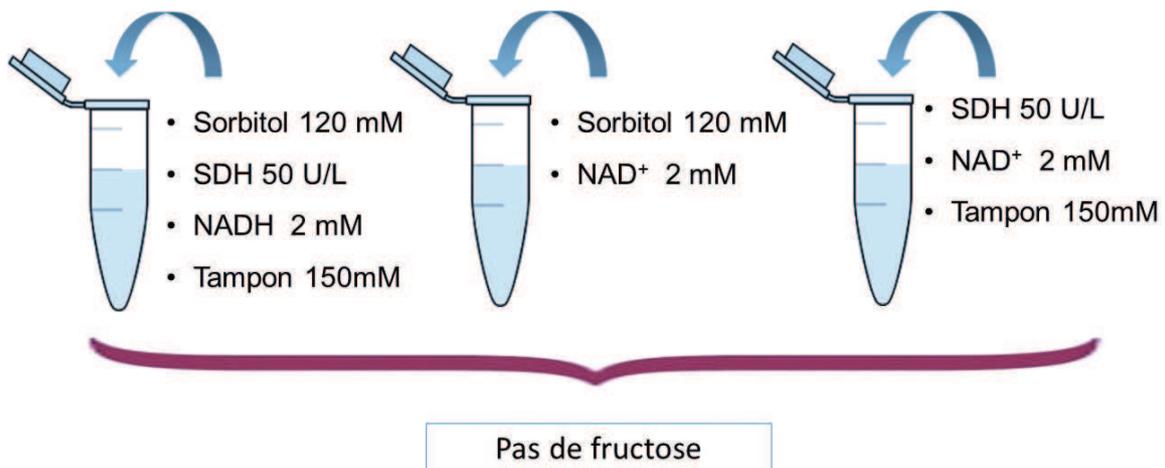


Figure 13 Tests blancs ayant permis de valider le lot de sorbitol déshydrogénase et son mode de conservation (pH 9)

Ces résultats confirment que pour pouvoir produire du NADH dans le milieu réactionnel, il est nécessaire de ré-oxyder le cofacteur NAD⁺, qui, dans nos conditions de tests s'avère stable.

Enfin, afin de s'affranchir d'une double analyse, nous avons démontré la corrélation entre le NADH et le fructose. Les deux produits sont dosés après 20 minutes de réaction dans les conditions optimales décrites dans le paragraphe suivant. Ces résultats sont montrés Tableau 3

Tableau 3 Corrélation Fructose/ NADH

Concentration en NADH obtenue par UV (mM)	0,48
Concentration en fructose obtenue par HPLiC (mM)	0,41

La corrélation entre les deux produits est comprise dans l'incertitude des mesures, et l'on peut donc considérer que les concentrations de NADH et de fructose produits sont équivalentes. En fonction des conditions opératoires, le suivi réactionnel se fera soit *via* la réduction du cofacteur soit *via* la production de fructose. En effet, le dosage du NADH par UV-vis peut s'avérer impossible dans le cas de milieux colorés. Cependant, lorsque cela est possible, les deux produits de la réaction seront dosés afin d'estimer de manière précise leurs concentrations.

3 Détermination de l'activité en fonction du pH

En fonction du pH, la littérature a montré que les deux réactions enzymatiques sont réversibles et thermodynamiquement orientées. Dans cette partie, les réactions enzymatiques de production de fructose sont réalisées en faisant varier le pH entre 6 et 10 à l'aide de différentes solutions tampons. La température est fixée à 37°C.

Deux solutions tampons différentes ont été utilisées pour obtenir des pH différents et couvrir une gamme large de pH :

- phosphate (Na_2HPO_4), 3 M, pour $6 < \text{pH} < 7$;
- tetraborate de sodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), 3 M, pour $8 < \text{pH} < 10$.

Le pH des solutions a été mesuré avant l'ajout de l'enzyme et en fin de réaction (30 min). Les valeurs sont résumées Tableau 4 pour la SDH et Tableau 5 pour la MDH.

Tableau 4 Variations du pH lors des tests enzymatiques avec l'enzyme SDH

Temps (min)	pH 6	pH 7	pH 8	pH 8,5	pH 9	pH 9,2	pH 9,4	pH 10
0	6,2	7,3	8,0	8,3	8,7	8,9	9,1	9,8
30	6,1	7,2	7,9	8,2	8,6	8,8	9,0	9,6

Tableau 5 Variations du pH lors des tests enzymatiques avec l'enzyme MDH

Temps (min)	pH 6	pH 7	pH 8	pH 8,5	pH 9	pH 9,2	pH 9,4	pH 10
0	6,2	7,3	8,0	8,5	8,8	8,9	9,2	9,8
30	6,1	7,3	7,8	8,2	8,7	8,8	9,0	9,6

Les pH de départ sont peu précis spécifiquement lorsque nous sommes dans la zone de pH basique car les concentrations de tampon sont relativement faibles. Pour plus d'exactitude, la valeur prise en compte sera la valeur exacte du pH et non celle de la solution tampon utilisée.

On observe une légère acidification du milieu lors de la réaction enzymatique qui s'explique par l'activité de l'enzyme libérant des protons. Ces protons sont par ailleurs en grande partie neutralisés par la solution tampon dont c'est le rôle.

La conversion du NAD^+ en NADH en fonction du temps a été mesurée en quantifiant le NADH produit par spectroscopie UV-vis (adsorption à 340 nm). Les résultats pour les enzymes SDH et MDH sont présentés dans les Figure 14 et Figure 15, respectivement.

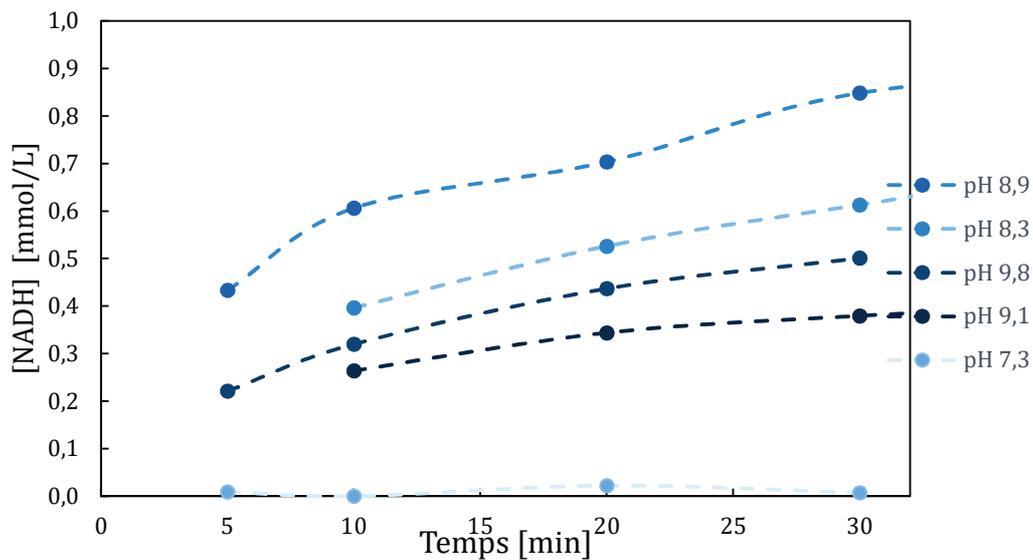


Figure 14 Cinétique de production de NADH par la sorbitol déshydrogénase (SDH) en fonction du pH.

Conditions opératoires : $T = 37^{\circ}\text{C}$, [tampon] = 150 mM, enzyme = 50 U.L⁻¹ d'enzyme/L, [NAD⁺] = 2 mM

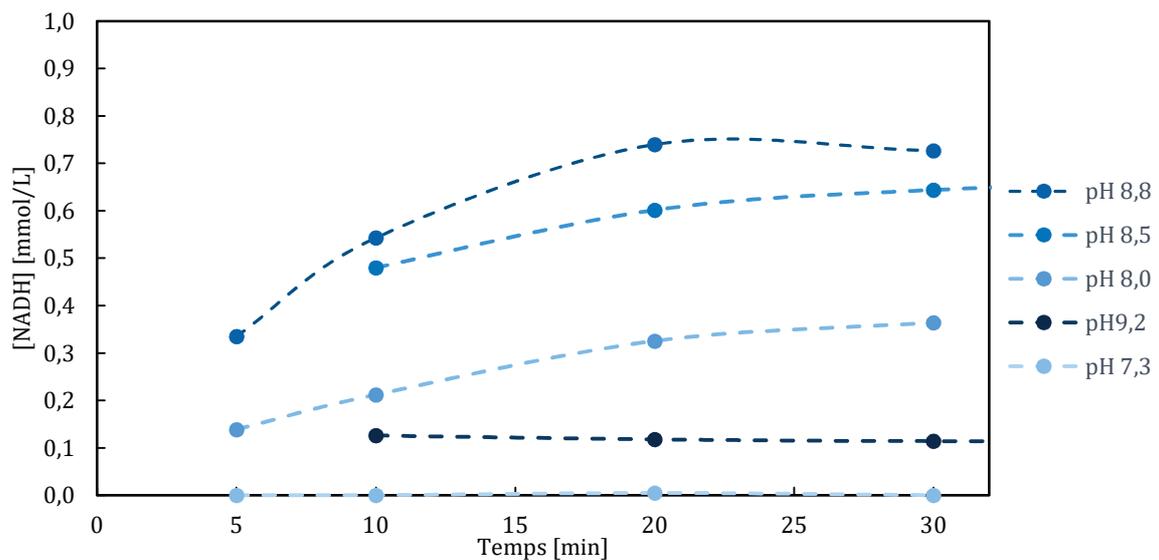


Figure 15 Cinétique de production de NADH par la mannitol déshydrogénase (MDH) en fonction du pH.

Conditions opératoires : $T = 37^{\circ}\text{C}$, [tampon] = 150 mM, enzyme = 50 U.L⁻¹ d'enzyme/L, [NAD⁺] = 2 mM

On constate un fort impact du pH sur la conversion du cofacteur NAD⁺, que ce soit pour l'enzyme SDH ou MDH. Cette dépendance peut être évaluée en calculant l'activité de l'enzyme. En effet, en se basant sur la production maximale de NADH (à pH 8,3 pour SDH et 8,7 pour MDH), il est possible de déterminer l'activité enzymatique pour chaque pH (Figure 16).

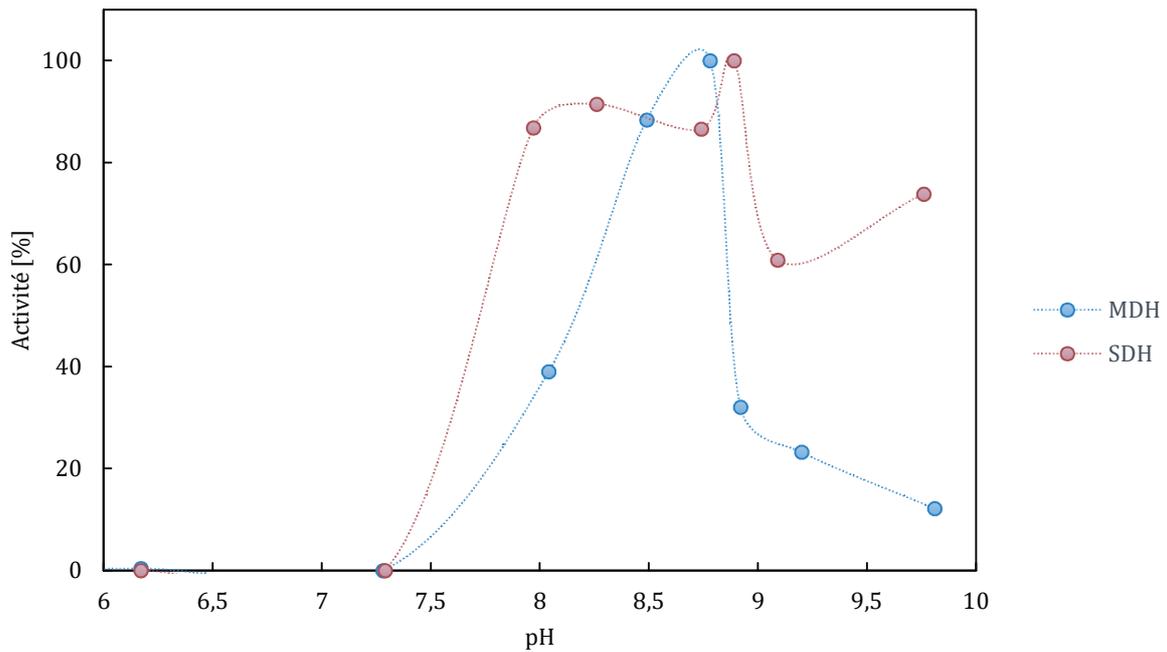


Figure 16 Evolution de l'activité des enzymes sorbitol (SDH) et Mannitol (MDH) déshydrogénase en fonction du pH et par rapport à un pH optimal autour de 8,5 pour la SDH et 8,7 pour la MDH. (production de NADH après 10 min, conditions opératoires : $T = 37^{\circ}\text{C}$, [tampon] = 150 mM, enzyme = 50 U.L⁻¹ d'enzyme/L, $[\text{NAD}^+] = 2 \text{ mM}$)

Pour la SDH, trois zones d'activité se distinguent clairement. L'enzyme est totalement inactive pour les pH inférieurs à 8 puis atteint son activité maximum pour des pH compris entre 8 et 9. Une activité supérieure à 50 % est encore observée pour des pH au-delà de 9. Nous pouvons donc établir que la zone de travail de la SDH peut se situer aux alentours de 8 avec une préférence pour un pH compris entre 8 et 9 car l'enzyme y est toujours très active.

On observe la même dépendance au pH pour la MDH avec cependant une zone d'activité optimale de l'enzyme beaucoup plus restreinte, autour du pH 8,7. Contrairement à la SDH, une faible variation de pH engendre un fort déclin de l'activité de la MDH. Ainsi, dans ce cas, nous fixerons le pH de l'enzyme à $8,7 \pm 0,2$.

Notons que ces mesures suggèrent des réactions enzymatiques rapides qui peuvent être étudiées à l'échelle de quelques minutes.

4 Détermination de l'activité des enzymes en fonction de la température

Après avoir déterminé le pH optimal pour les deux conversions enzymatiques, il est important de réaliser ces réactions à ce pH et à différentes températures. La littérature à propos de l'activité en

fonction de la température pour la MDH choisie nous permet d'avoir les informations nécessaires. La MDH a une activité optimale à 37 °C.¹⁶ Nous avons donc réalisé les mesures expérimentales uniquement pour l'enzyme SDH. Le pH a été mesuré puis ajusté à 9 lorsque le milieu réactionnel (sans l'enzyme) atteint la température désirée. La concentration de NADH a été mesurée par spectroscopie UV-vis à différents temps de réaction. La conversion de NAD⁺ en fonction du temps pour les trois températures testées est présentée dans la

Figure 17 pour la SDH.

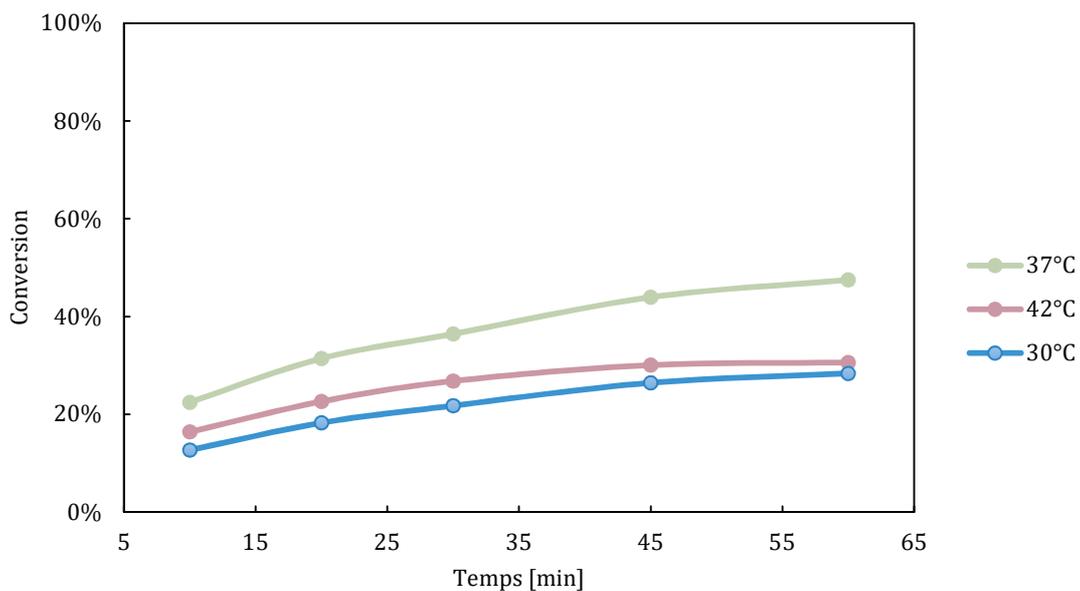


Figure 17 Cinétique de conversion du NAD⁺ à différentes températures pour l'enzyme SDH

Conditions opératoires : [tampon] = 150 mM, enzyme = 50 U.L⁻¹, [NAD⁺] = 2 mM

La conversion maximale est obtenue à la température de 37°C. Lorsque la température est plus élevée, la conversion atteint son taux de conversion maximal plus rapidement mais ce taux est plus faible qu'à 37°C. Ceci semble montrer que la stabilité de l'enzyme est plus fragile à ces températures. L'enzyme est également active à de plus basses températures (30 °C) mais avec une activité diminuée de l'ordre de 50 % après 45 min de réaction.

¹⁶ Slatner, M.; Nidetzky, B.; Kulbe, K. D. *Biochemistry* **1999**, *38* (32), 10489–10498.

Conclusion

Le choix d'une enzyme pour mettre en évidence le concept de catalyse hybride est déterminant. Des lots d'enzymes commerciales Mannitol déshydrogénase et Sorbitol déshydrogénase ont été sélectionnés en fonction de plusieurs critères importants pour démontrer ce concept. Les données disponibles dans la littérature et quelques expériences de contrôle nous ont permis de définir ensuite les conditions opératoires optimales de ces enzymes. Les deux réactions enzymatiques montrent des cinétiques de conversion rapides. Nous avons également établi une température optimale de travail de 37°C permettant d'assurer le meilleur rapport stabilité/activité pour les deux enzymes, bien qu'elles soient actives sur une plus large gamme de températures. Enfin, une fenêtre d'activité a pu être établie en fonction du pH pour chacune d'entre elles. Ces fenêtres sont représentées en Figure 18.

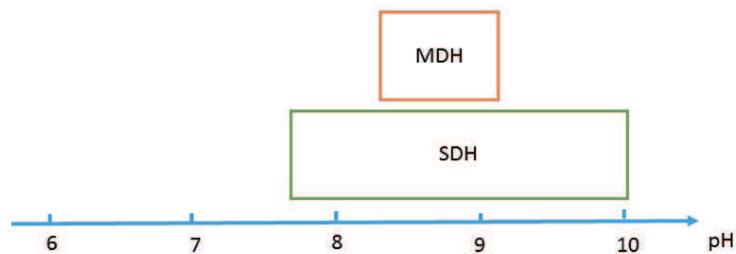


Figure 18 Fenêtres d'activité en termes de pH des deux enzymes utilisées

L'ensemble de ces essais servira de référence pour nos tests hybrides. Il sera ainsi possible d'évaluer, par exemple, les effets indésirables sur l'enzyme de l'ajout du complexe organométallique dans le milieu réactionnel.

Cette étude a également permis une familiarisation de la mise en œuvre de réactions enzymatiques en termes expérimental et analytique intégrant la production de fructose à l'aide d'alcool déshydrogénases générant simultanément un cofacteur réduit qu'il faut à terme régénérer.

Partie expérimentale

Produits chimiques

Les produits chimiques : sorbitol, fructose, hydroxyde de sodium, les cofacteurs NADH et NAD⁺ et l'enzyme Sorbitol déshydrogénase (SDH) ont été fournis par Sigma Aldrich avec la plus grande pureté disponible. Les solutions tampons phosphate et tétraborate ont été fournies par Fischer Scientific. L'enzyme Mannitol déshydrogénase a été fournie par Megazyme.

Après réception, les enzymes ont été solubilisées dans 10 mL d'eau milliQ, aliquotées dans des Eppendorf puis stockées à -21°C. Les autres produits chimiques ont été utilisés sans purification supplémentaire.

L'eau milliQ a été utilisée pour préparer les solutions nécessaires.

Réactions enzymatiques

Les réactions enzymatiques ont été conduites dans des Eppendorf placés dans un multiréacteur Eppendorf Thermomixer C. Le polyol (120 mM) est mis en solution avec le NAD⁺ (2 mM), l'enzyme (50 U.L⁻¹) et le tampon (150 mM) pour ajuster au pH désiré dans un Eppendorf de volume 5 mL. La réaction débute lors de l'ajout de l'enzyme au milieu. Un échantillon de 1 mL est prélevé toutes les 5 minutes puis son absorbance est mesurée par spectroscopie UV-vis à 340 nm. La concentration en NADH est ensuite déduite de l'absorbance mesurée par rapport à une calibration.

Le pH est mesuré à l'aide d'une électrode pH InLab Micro de Mettler Toledo lorsque la température désirée de la solution est atteinte.

Analyses

Pour le dosage de NADH, les solutions standards et les références pour le NADH et NAD⁺ sont préparées dans de l'eau milliQ. Le spectromètre Perkin Elmer Lambda 650S UV-vis a été utilisé avec des cuvettes en PMMA de longueur 1 cm (0.5 mL) pour mesurer l'absorbance des standards ou des échantillons qui ont été dilués si besoin. Toutes les analyses ont été effectuées à 25°C. Les calibrations ont été effectuées en mesurant l'absorbance de différentes concentrations de NADH à 340 nm. Elles permettent d'obtenir le coefficient d'extinction molaire du NADH utilisé en utilisant la loi de Beer-Lambert. Ce coefficient est ensuite utilisé pour calculer les concentrations en NADH des échantillons prélevés.

Pour le dosage de fructose, les solutions standards et les échantillons ont été analysés soit par HPLC soit par HPLIC. Les échantillons ont été dilués si nécessaire. L'HPLC de marque Shimadzu est équipé d'un détecteur à indice de réfraction (RID). Une colonne Agilent metacarb 87p a été utilisée pour les quantifications du fructose et des polyols. La phase mobile est de l'eau milliQ à un débit de $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, la température de la colonne et du RID sont de 80°C et 35°C , respectivement, pour une détection et une résolution optimale. Pour des faibles concentrations, l'HPLIC Dionex ICS 3000 a été utilisée avec une détection ampérométrique pulsée (PAD). La colonne CarboPac PA1 carbohydrate (4x250 mm, de Dionex, Thermofischer Scientific, Inc.), la pré-colonne CarboPac PA1 carbohydrate (4x50 mm) et une post-colonne ont été utilisées. La phase mobile étant composée de soude avec 15 mM de NaOH pour la pré-colonne et la colonne, et 300 mM de NaOH pour la post-colonne à un débit de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La température du four est fixée à 30°C .

Méthodes

Les rendements sont calculés par rapport au réactif limitant NAD^+ selon Équation 1.

Équation 1 Equation de calcul du rendement

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{[\text{NADH}]}{[\text{NAD}^+]_0} \times 100$$

Chapitre 3 Régénération du cofacteur par catalyse organométallique – Etude combinée expérimentale et théorique

Introduction - Méthodologie

L'état de l'art nous a permis d'identifier des complexes organométalliques potentiellement capables d'oxyder sélectivement le NADH en NAD^+ dans des conditions qui seraient compatibles avec une réaction enzymatique impliquant une alcool déshydrogénase. Deux mécanismes pour la régénération du cofacteur ont été proposés selon les complexes : un mécanisme oxydant avec une porphyrine de fer et un mécanisme de transfert d'hydrure avec des complexes organométalliques à base de métaux nobles (Rh, Ru, Ir). Nous avons fait le choix d'initier notre travail avec l'étude parallèle de ces deux voies appliquées à notre réaction de régénération : d'une part avec la porphyrine de fer décrite en catalyse hybride par l'équipe de Gröger¹ et d'autre part avec un complexe organométallique d'iridium utilisé par l'équipe de Sadler.² (Figure 1).

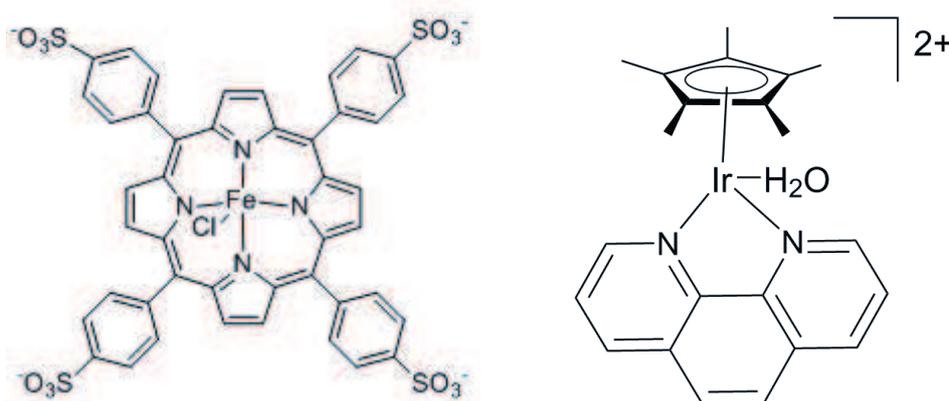


Figure 1 Complexes pour l'étude de la régénération du NAD^+ : tétraphénylporphyrine de fer sulfonée (à gauche) et $[(\text{pentaméthylcyclopentadiène})\text{Ir}(\text{phénantroline})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (à droite)

¹ Maid, H.; Böhm, P.; Huber, S. M.; Bauer, W.; Hummel, W.; Jux, N.; Gröger, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50* (10), 2397–2400.

² Betanzos-Lara, S.; Liu, Z.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M.; Qamar, B.; Sadler, P. J. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51* (16), 3897–3900.

Dans un premier temps, nous exposons la démarche méthodologique avec l'exemple de la porphyrine de fer et les raisons qui ont amené à l'abandon de cette voie au profit de l'utilisation de complexes d'iridium.

Dans un second temps, et cela constituera l'étude majeure du travail de thèse, nous présentons la synthèse et la caractérisation de ce premier complexe de référence à base d'iridium. Nous poursuivons avec les premiers essais expérimentaux de régénération de NAD^+ , dans un premier temps sans couplage enzymatique, afin de bien caractériser la réaction organométallique en elle-même. Une étude de modélisation moléculaire à l'aide de la DFT a été menée en parallèle pour caractériser les étapes déterminantes du mécanisme de régénération et identifier les paramètres critiques. A la lumière de cette étude, de nouveaux essais expérimentaux spécifiques ont été réalisés pour confronter les hypothèses de modélisation aux observations expérimentales.

Pour suivre la transformation de NADH en NAD^+ , nous avons recherché des méthodes d'analyses simples permettant de discriminer les deux cofacteurs pour les quantifier. Deux méthodes peuvent répondre à ce besoin :

- La Résonance Magnétique Nucléaire du proton (^1H RMN) permet de bien différencier les signaux protons du noyau pyridinium (NAD^+) et de sa forme réduite dihydropyridine (NADH) pour quantifier chacune des deux espèces (Figure 2).

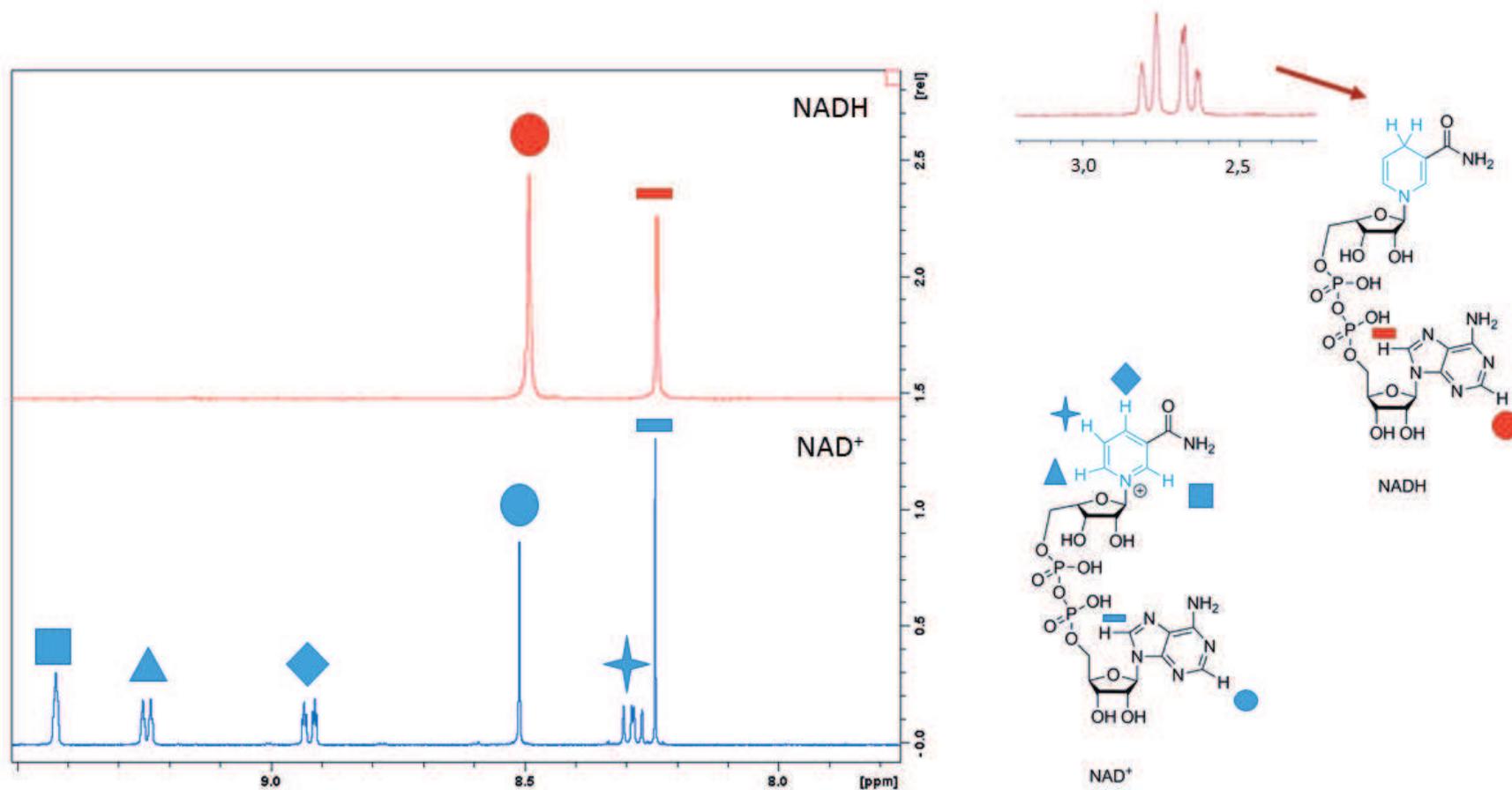


Figure 2 Spectres ^1H RMN du NADH et du NAD^+ dans la zone aromatique avec attribution des signaux + zoom entre 2,5 et 3,0 ppm pour le NADH

- La spectroscopie ultraviolet-visible (UV-vis) est également bien adaptée car le NADH possède une bande d'absorption supplémentaire à 340 nm le différenciant aisément du NAD⁺, comme le montre la Figure 3.

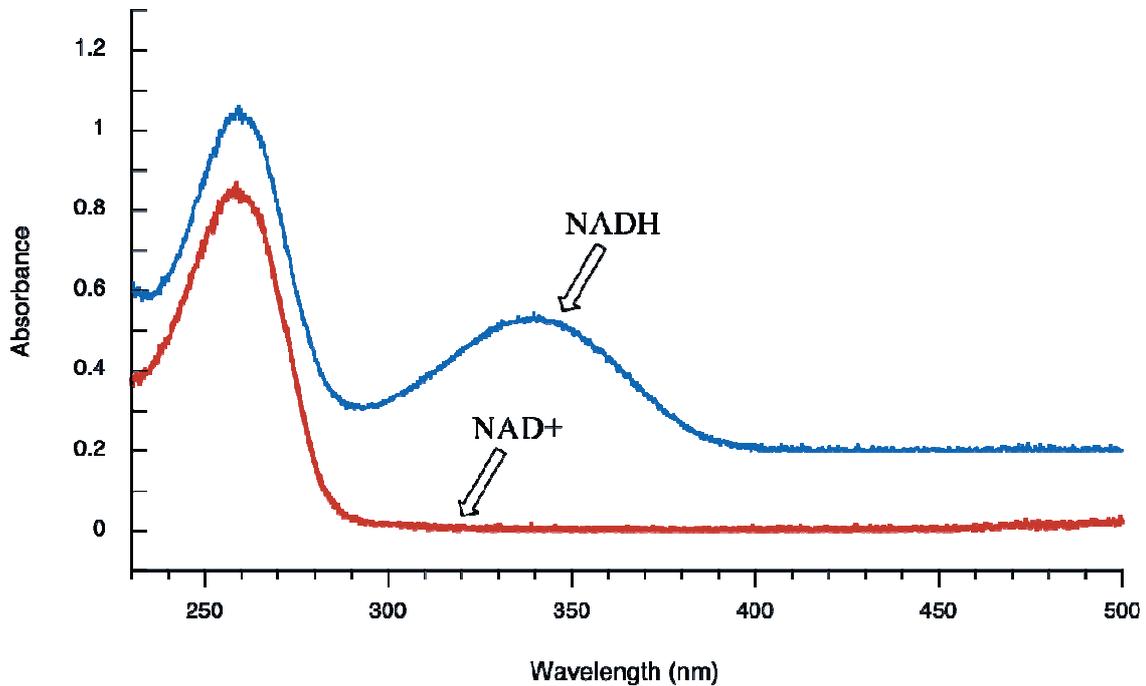


Figure 3 Spectre d'absorption UV-visible pour les cofacteurs NADH et NAD⁺

Nous verrons spécifiquement dans chacune des parties consacrées aux complexes de fer et d'iridium si leur spectre RMN ¹H et leur spectre d'adsorption ne perturbent pas la quantification des cofacteurs.

La tétraphénylporphyrine de fer sulfonée (Fe-TPPS) est disponible commercialement chez le fournisseur PorphChem. Elle possède un atome de Fe(III) qui, par sa structure électronique, rend le complexe paramagnétique. Par définition, le complexe ne possède pas d'aimantation, cependant sous l'effet d'un champ magnétique extérieur, le complexe adoptera une aimantation dans la même direction que le champ appliqué. Cette propriété rend le complexe inobservable par RMN ¹H dans les conditions de régénération du cofacteur. Pour la spectroscopie d'absorption, l'absorbance du complexe Fe-TPPS dans le domaine UV-visible a été mesurée à une concentration de 20 mM dans de l'eau distillée. Les premiers signaux étant saturés, il a été nécessaire de diluer les solutions jusqu'à obtenir un spectre non saturé. La Figure 4 représente l'absorbance de la porphyrine à une concentration de 0,002 mM.

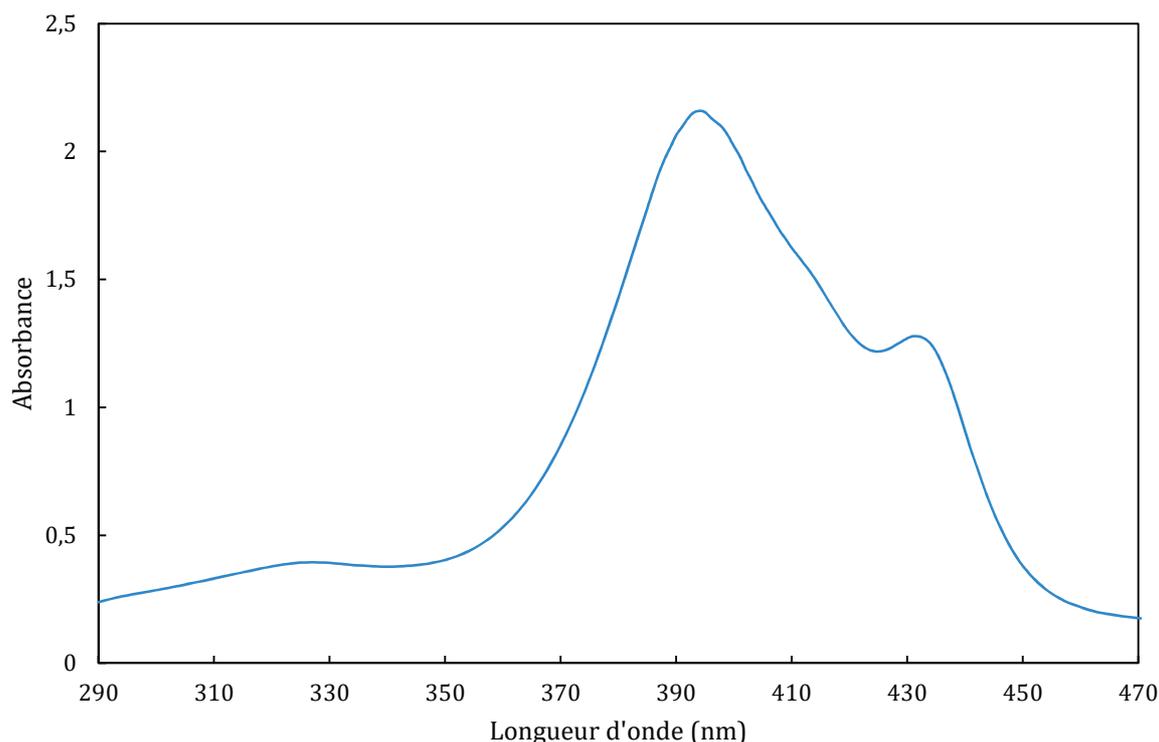


Figure 4 Absorbance en fonction de la longueur d'onde pour la porphyrine de fer sulfonée (0,002 mM)

Ainsi, nous pouvons voir que l'absorbance à 340 nm est significative même à des concentrations très faibles. En parallèle, les mesures d'absorbance du NADH sont effectuées pour des concentrations allant de 0,01 mM à 0,25 mM. A partir de la loi de Beer-Lambert on peut comparer les coefficients d'extinction molaire des deux composés.

$$\epsilon_{\text{NADH}}(340\text{nm}) = 4\,121 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} ; \epsilon_{\text{Fe-TPPS}}(340\text{nm}) = 188\,753 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

On peut donc voir que la porphyrine absorbe près de 50 fois plus à 340 nm que le cofacteur. Dans le cas d'un test de régénération du NAD^+ , où le complexe organométallique est utilisé en quantité stœchiométrique ou en quantité catalytique par rapport au cofacteur NADH introduit, le signal d'absorbance mesuré sera donc saturé par le complexe. L'incertitude sur la mesure est trop importante par rapport aux valeurs attendues pour l'absorbance du NADH à 340 nm. Par conséquent, nous avons éliminé la possibilité d'utiliser la spectrométrie UV-visible pour étudier la régénération du cofacteur par le Fe-TPPS.

La porphyrine de fer va donc fortement perturber les analyses avec les deux méthodes envisagées pour suivre la consommation de NADH ou l'apparition de NAD^+ .

Dans les travaux de Gröger *et coll.*, les analyses sont réalisées sur les produits organiques des réactions enzymatiques. Ainsi, ils doivent procéder à l'extraction du produit de la réaction puis à sa quantification par RMN *ex situ*. Aucun suivi cinétique *in-situ* n'est réalisé dans ces travaux.

La porphyrine de fer pose donc des problèmes évidents de méthodologie pour la mesure de l'activité oxydante du complexe sur NADH et pour le suivi cinétique de la réaction. Outre les désavantages analytiques liés à la porphyrine de fer, le récent intérêt pour les complexes d'iridium³ envisagés dans notre étude nous a poussé à focaliser notre stratégie vers ces derniers. Après quelques essais expérimentaux infructueux avec la porphyrine de fer, nous avons donc recentré notre étude sur la régénération de NAD⁺ par le complexe d'iridium présenté en Figure 1. Après validation de la méthodologie analytique par RMN ¹H et UV-visible, la synthèse et la caractérisation de ce complexe font l'objet du paragraphe suivant.

³ Cf Chapitre 1 Bibliographie

I Synthèse et caractérisations du complexe [(pentaméthylcyclopentadiène)Ir(phénantroline)(H₂O)]²⁺

1 Synthèse

Le complexe [(pentaméthylcyclopentadiène)Ir(phénantroline)(H₂O)]²⁺, que l'on notera de manière plus pratique [Cp*Ir(phen)(H₂O)]²⁺ est obtenu à partir de 1,10-phénantroline et de [Cp*IrCl₂]₂ sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 60%. La méthode suivie est celle décrite par Sadler *et coll.*⁴ avec un contre-anion nitrate. On notera qu'une attention toute particulière doit être portée sur l'étape de recristallisation pour l'obtention d'un complexe organométallique pur. La méthode de synthèse est décrite dans la partie expérimentale à la fin de ce chapitre.

2 Caractérisations

2.1 Résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN ¹H et ¹³C enregistrés à la suite de la synthèse sont proposés en Figure 5 et Figure 6, respectivement, avec l'attribution des différents signaux. Ces spectres démontrent l'obtention d'un composé pur, exploitable pour les tests catalytiques. Des spectres RMN ¹H ont également été réalisés 5 jours puis 10 jours après synthèse et stockage à l'air libre à température ambiante à l'abri de la lumière, démontrant la stabilité du composé durant cette période et sous ces conditions.

Le spectre RMN 2D de type NOESY permettant d'évaluer les interactions spatiales des protons est proposé en Figure 7 et permet de montrer la coordination des ligands 1,10-phénantroline et pentaméthylcyclopentadiényle (Cp*) sur l'atome d'iridium.

⁴ Liu, Z.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M.; Fletcher, S. A.; Kisova, A.; Vrana, O.; Salassa, L.; Bruijnincx, P. C. A.; Clarkson, G. J.; Brabec, V.; Sadler, P. J. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3011–3026.

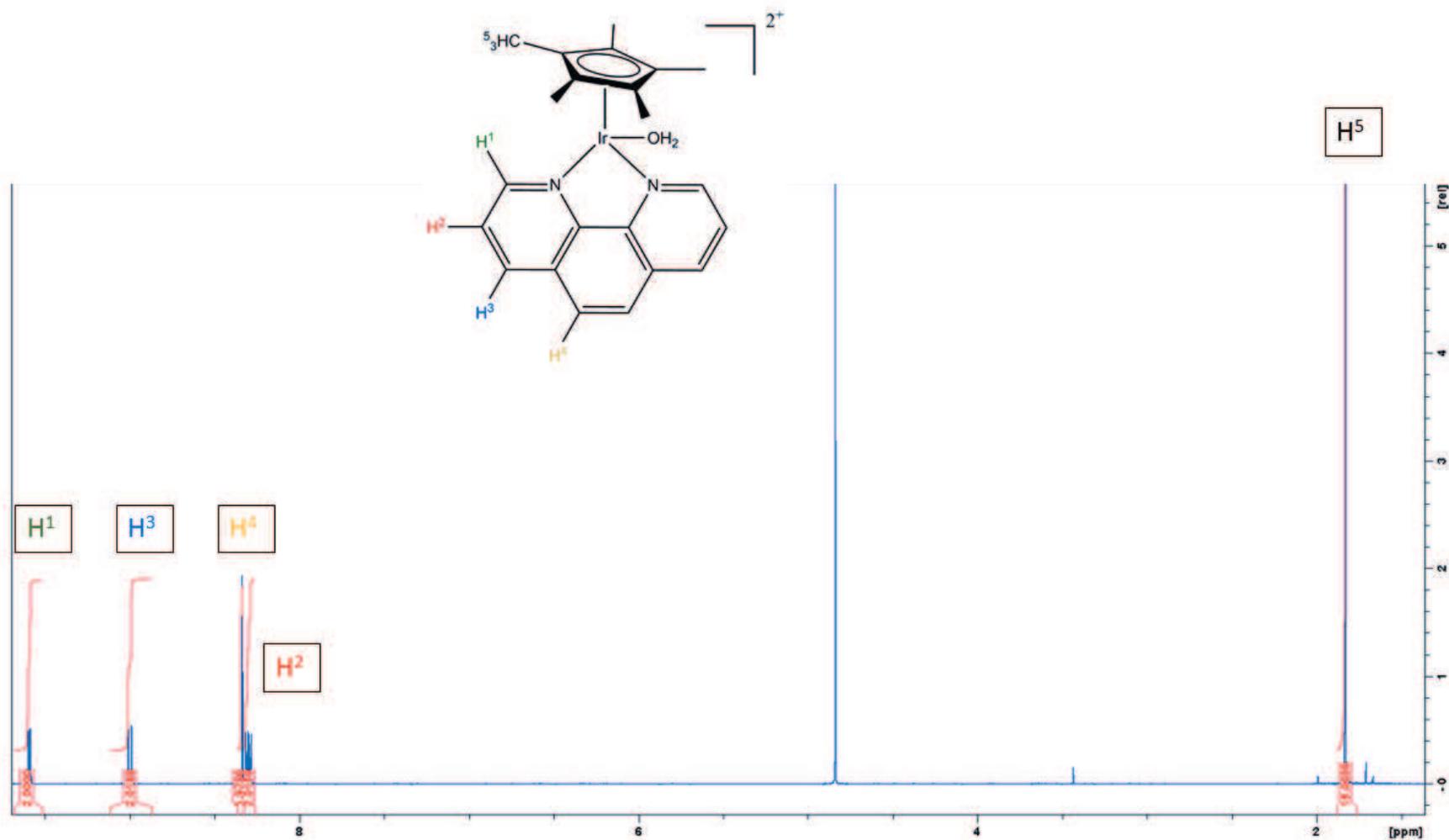


Figure 5 RMN ^1H du complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (le signal à 4,75 ppm étant le signal résiduel de HDO dans D_2O)

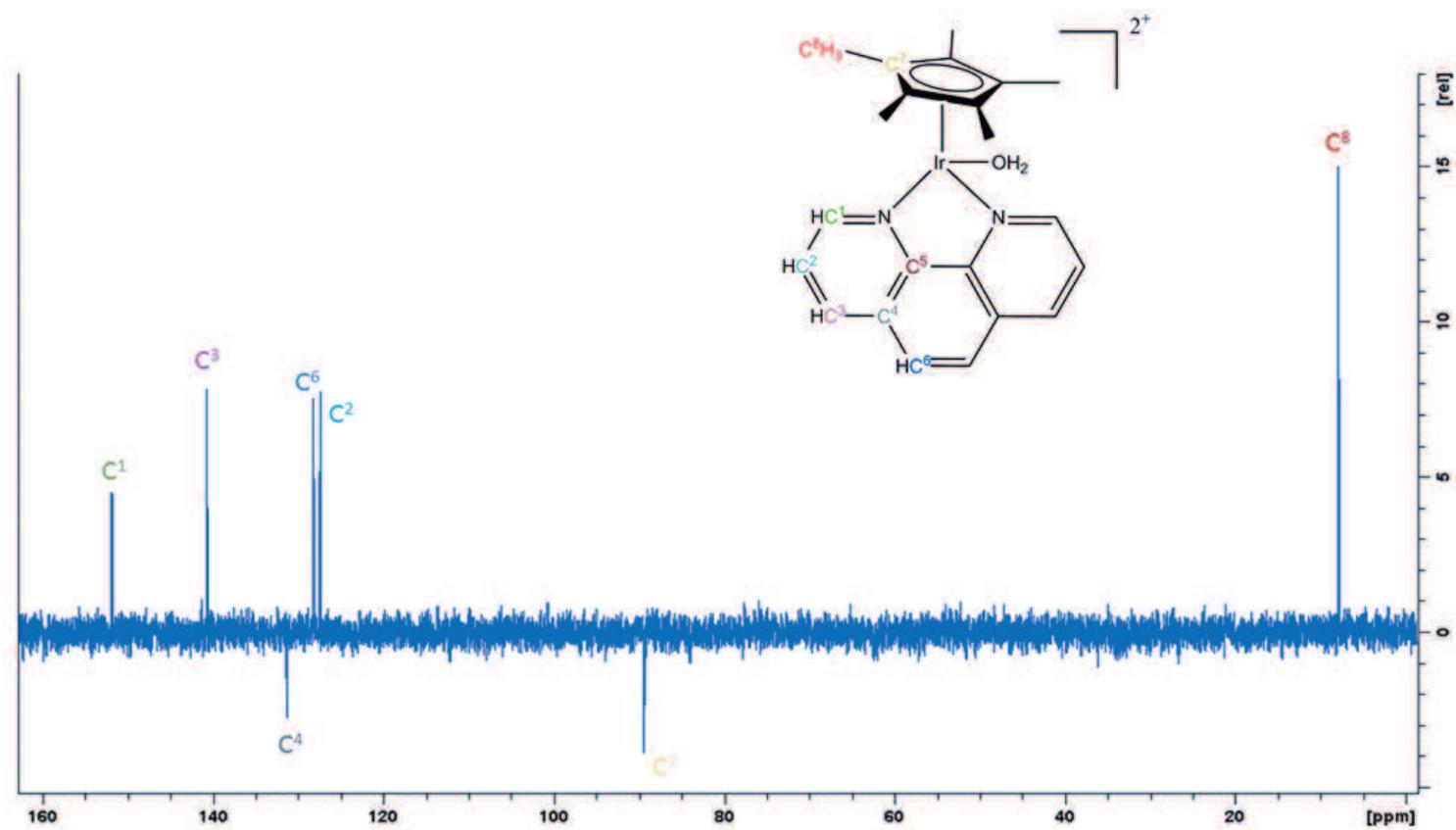


Figure 6 RMN ^{13}C séquence APT (Attached Proton Test) du complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$

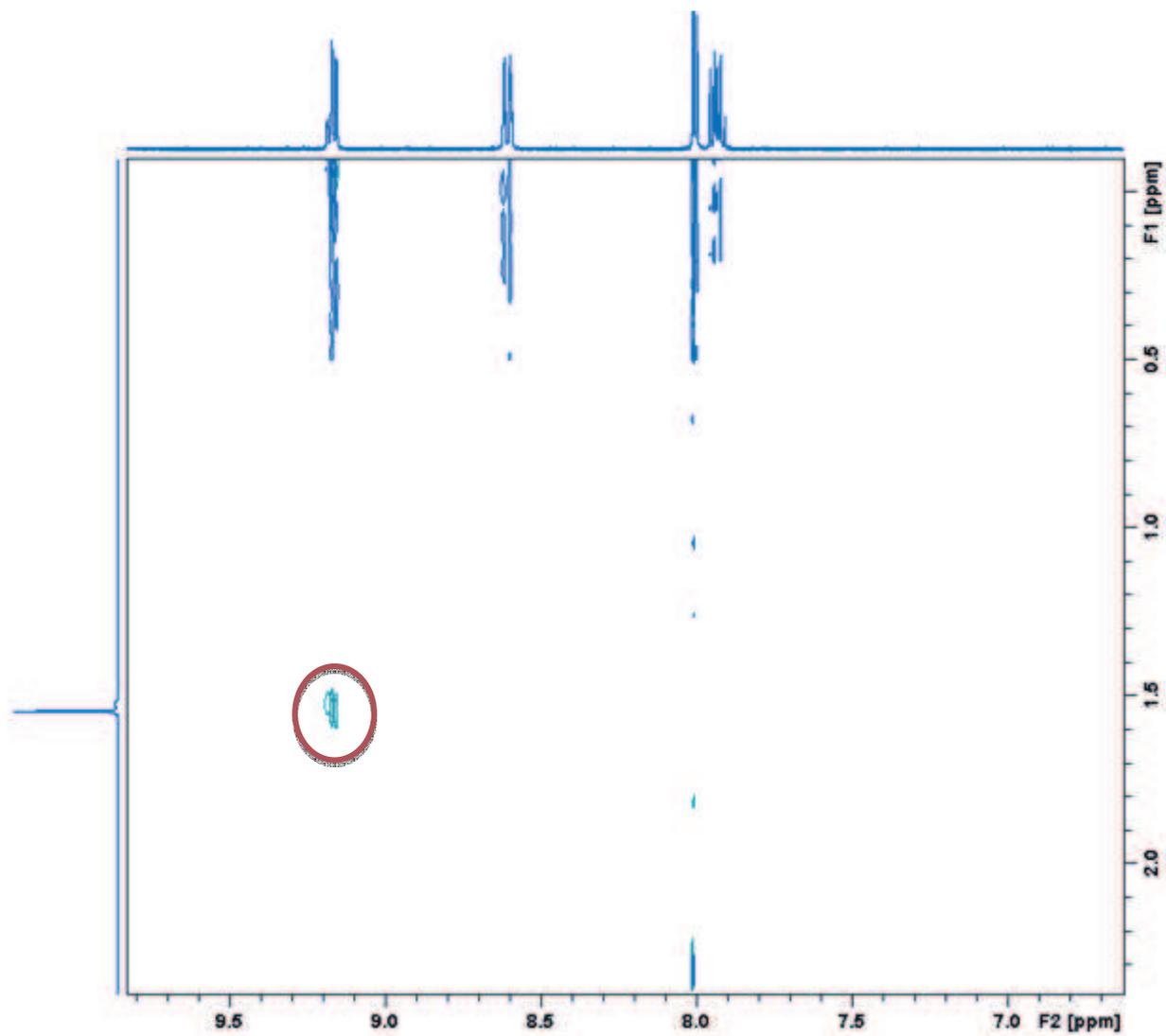
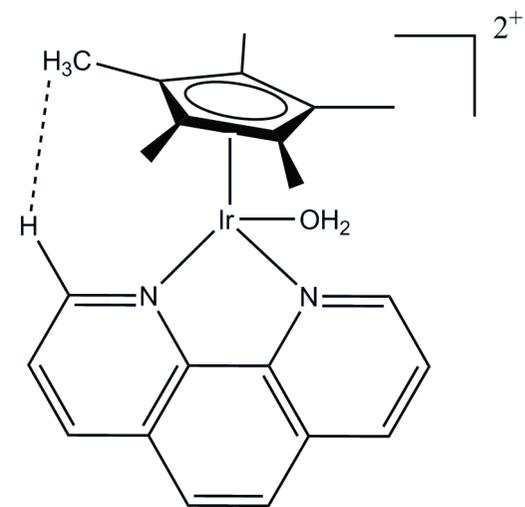


Figure 7 RMN 2D NOESY du complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$



Les signaux obtenus sur les spectres ^1H RMN sont semblables à ceux décrits dans la littérature à la différence près de la valeur absolue des déplacements chimiques liés à la nature du solvant : D_2O dans notre cas, et DMSO-d^6 dans la littérature. Les signaux des carbones sont attribués grâce au signe du signal obtenu dans le spectre RMN ^{13}C APT (pour Attached Proton Test), les carbones primaires (CH_3) et tertiaires (CH) étant positifs et les carbones secondaires (CH_2) et quaternaires (C) étant négatifs. Ensuite, les signaux sont attribués en fonction de leur environnement. À notre connaissance, les spectres RMN ^{13}C et 2D RMN NOESY n'ont jamais été présentés dans la littérature et nos travaux permettent ainsi des confirmations supplémentaires : le spectre RMN 2D de type NOESY démontre la coordination des deux ligands sur l'iridium. En effet, on peut observer une tâche de corrélation, encadrée en rouge sur le schéma, correspondant à une interaction spatiale entre les protons du ligand Cp^* à 1,5 ppm et ceux du ligand phénantroline à 9,2 ppm, proton en alpha de l'azote.

D'après ces spectres, nous pouvons en déduire que le complexe obtenu est pur après recristallisation. Il possède un ligand Cp^* et un ligand phénantroline sur l'atome d'iridium. Cependant, ces techniques ne nous ont pas permis d'obtenir d'informations sur la présence du ligand aqua sur l'iridium. Afin de l'identifier, nous avons entrepris des analyses supplémentaires à l'aide de la diffraction des rayons X (DRX).

2.2 Diffraction des rayons X

La DRX a été réalisée sur des monocristaux du complexe obtenu par diffusion lente de diéthyléther dans une solution de méthanol contenant le complexe. Ces diffractogrammes permettent de remonter à la maille cristalline et de s'assurer de la composition effective du complexe isolé présenté en Figure 8.

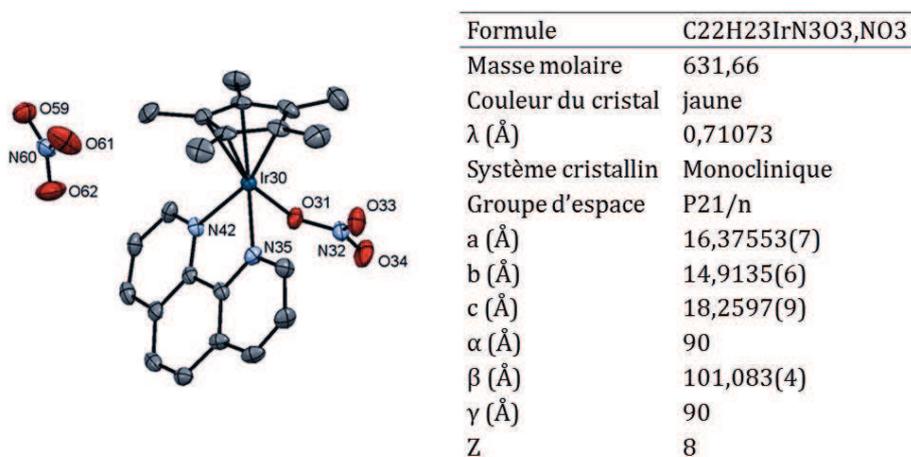


Figure 8 Structure cristalline du complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{NO}_3)]^+$ obtenue par DRX

On observe que le monocristal porte non pas un ligand aqua mais un contre ion nitrate sur l'iridium. Notons qu'un tel complexe portant cette fois un ligand NO_3^- est décrit dans un brevet concernant des catalyseurs de déshydrogénation de l'acide formique.⁵

La cristallisation ayant lieu en absence notable d'eau, ceci peut expliquer la substitution du ligand aqua initialement attendu par un ligand nitrate, contre-anion du complexe d'iridium. En solution aqueuse, le ligand nitrate est sans aucun doute décoordiné et remplacé par un ligand aqua : le nitrate est un ligand peu coordinant et, en solution aqueuse, il entre en compétition avec le ligand aqua qui est évidemment en large excès. L'équipe de Albrecht a en effet montré l'établissement d'équilibres entre des ligands X chlore et L aqua en solution pour un complexe organométallique de type organo-iridium similaire au complexe étudié.⁶ Le ligand chlore étant plus coordinant que le ligand nitrate, on peut donc conforter notre hypothèse de labilité du ligand NO_3^- pour une espèce aqua lors des tests de régénération qui ont lieu en phase aqueuse.

La structure du complexe est connue et sa synthèse est maîtrisée nous permettant de l'obtenir avec la pureté requise pour les tests catalytiques. Nous avons ensuite envisagé la régénération du NAD^+ à partir de NADH par ce complexe organométallique.

⁵ Y. Himeda, W.-H. Wang, Y. Amamoto WO2015076156, **2015**

⁶ A. Petronilho, A. Llobet, M. Albrecht *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 12896–12901.

II Régénération du NAD⁺

1 Suivi de la régénération par spectrométrie UV-visible

Comme présenté dans l'introduction de ce chapitre, l'interconversion entre le NADH et le NAD⁺ peut être suivie par UV-visible grâce à la bande d'absorption caractéristique du NADH à 340 nm. Un test de régénération du NAD⁺ avec le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ est effectué en préparant une solution équimolaire de NADH et de complexe. En parallèle, une référence contenant la même concentration de complexe dans l'eau milliQ est préparée. Nous voulons ainsi suivre la concentration de NADH en mesurant l'absorbance à 340 nm. Cependant, de manière inattendue, lorsque le cofacteur et le complexe réagissent, une coloration immédiate de la solution a lieu comme le montre la Figure 9.

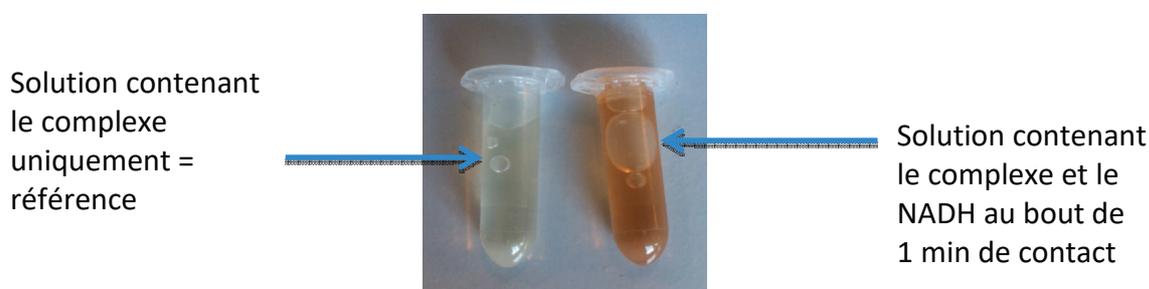


Figure 9 Test de régénération de NAD⁺ avec le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$

Un spectre d'absorption a été enregistré entre les longueurs d'onde 220 nm et 750 nm révélant une absorbance très importante à une longueur d'onde de 304 nm. Le complexe seul absorbe à 294 nm, le NADH à 298 nm et 340 nm, et le NAD⁺ à 298 nm. Ainsi, on pourrait attribuer la longueur d'onde 304 nm à une nouvelle espèce formée, de manière covalente ou non. Nous avons émis l'hypothèse que le NADH se complexe très rapidement sur l'iridium donnant lieu à cette coloration vive. Dans les travaux des équipes de Canivet et Sadler, le mécanisme proposé implique la complexation du NADH sur le complexe d'iridium avec assistance du carbonyle du résidu nicotinamide, donnant lieu à l'adduit **(3)** dans lequel le NAD⁺ et l'hydrure forment un cycle à 6 centres cinétiquement stable. (Figure 10).

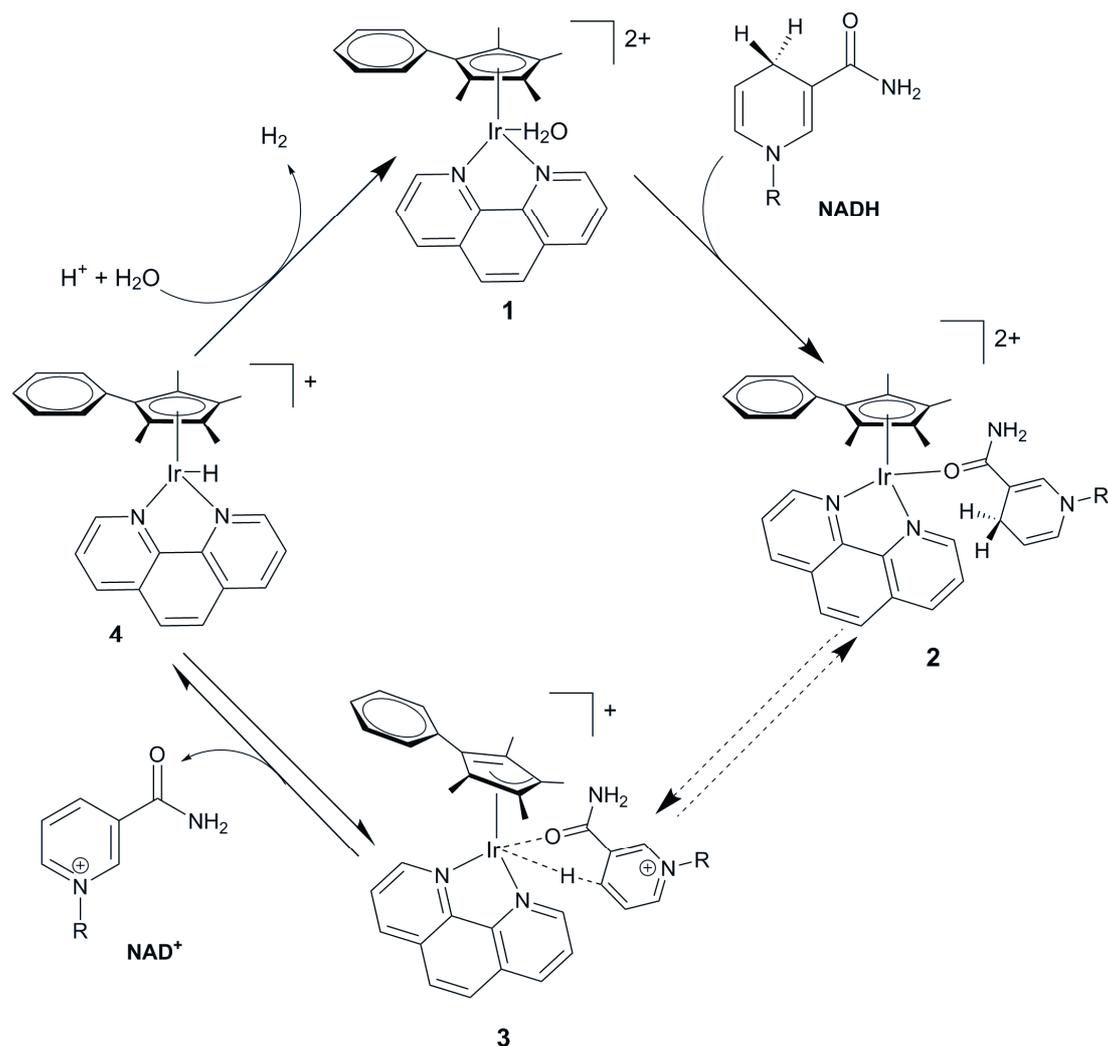


Figure 10 Mécanisme de régénération du NAD⁺ proposé par Sadler et coll.

Ce mécanisme fait intervenir un « ring slippage » d'une coordination η^5 à η^3 du ligand cyclopentadiène (**3**) pour complexer le NADH sur l'iridium et ainsi transférer un hydrure sur le métal (**4**). Ensuite, une protonation du complexe iridium-hydrure entraîne un dégagement de dihydrogène et la formation du complexe [Cp*Ir(phen)(H₂O)] dicationique de départ (**4**→**1**).

Une ou plusieurs des espèces proposées dans le mécanisme peuvent également absorber à 340 nm et fausser les quantifications de concentration en NADH. Ne connaissant pas précisément la nature exacte de toutes les espèces dans le milieu, il est préférable d'étudier la régénération par RMN ¹H plutôt que par UV-vis afin de s'assurer de la justesse des mesures. Il est toutefois surprenant de constater que la technique d'absorption ait été utilisée par l'équipe de Sadler pour étudier la régénération de NAD⁺. Nous anticipons donc quelques difficultés pour comparer rigoureusement nos résultats avec les leurs.

2 Suivi de la régénération par RMN

2.1 Résultats préliminaires : tests « blancs »

Dans un premier temps, les spectres RMN ^1H des composés seuls ont été acquis et les signaux des protons ont été attribués aux molécules respectives. Les spectres partiels avec identification des signaux caractéristiques dans la zone aromatique (7,5 - 10,0 ppm) sont présentés en Figure 11.

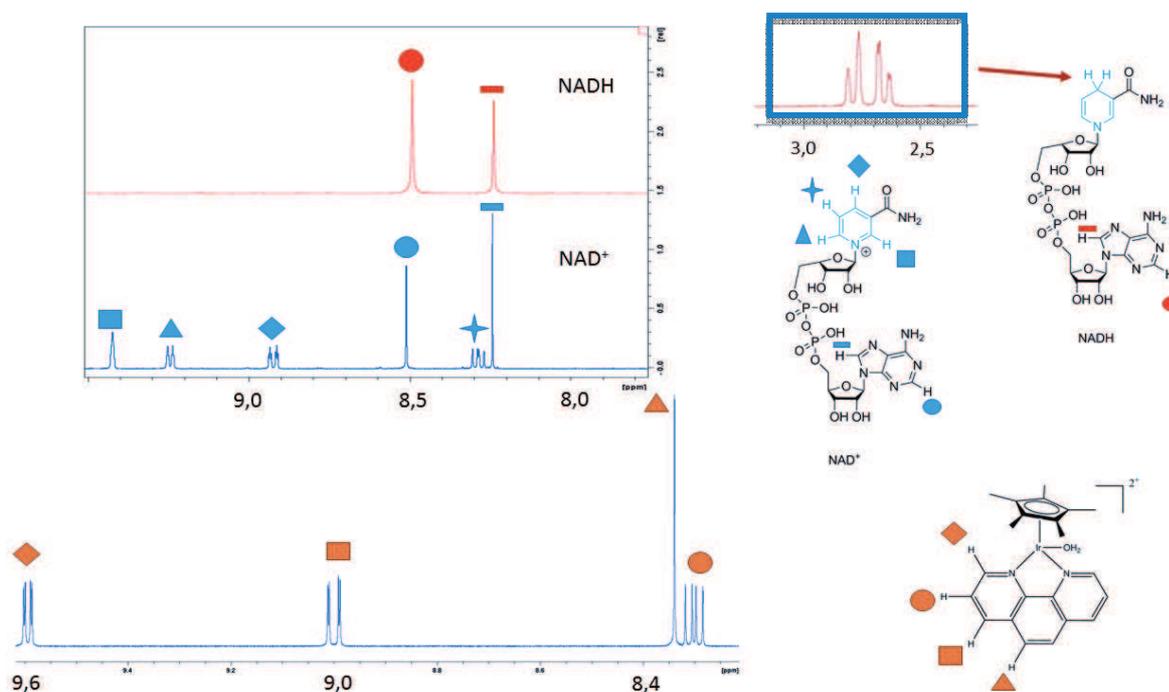


Figure 11 ^1H RMN du NAD⁺ (en bleu), du NADH (en rouge) et du complexe (en jaune) dans la zone aromatique et attribution des signaux + zoom NADH entre 2,5 et 3,0 ppm

On notera le signal des protons énantiotopes du résidu dihydropyridine du NADH qui forment un système AB à 2,7 ppm également visible dans l'encadré de la Figure 11.

La réaction entre le cofacteur oxydé (NAD⁺) et le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ - en proportions catalytiques (10 % molaire complexe/NAD⁺) dans un premier temps - a été suivie par l'acquisition de spectres RMN ^1H à intervalles réguliers. L'objectif était de traquer une éventuelle réactivité non souhaitée entre ces deux espèces, réactivité qui compromettrait la mise en œuvre d'une réaction hybride de régénération de NAD⁺ à partir de NADH car le NAD⁺ doit être converti par l'enzyme et non par le complexe pour une parfaite synergie entre les catalyseurs.

Les spectres RMN ^1H extrêmes (i.e. au début et à la fin de l'expérience) obtenus après respectivement 10 minutes et 7 heures de contact sont présentés Figure 12.

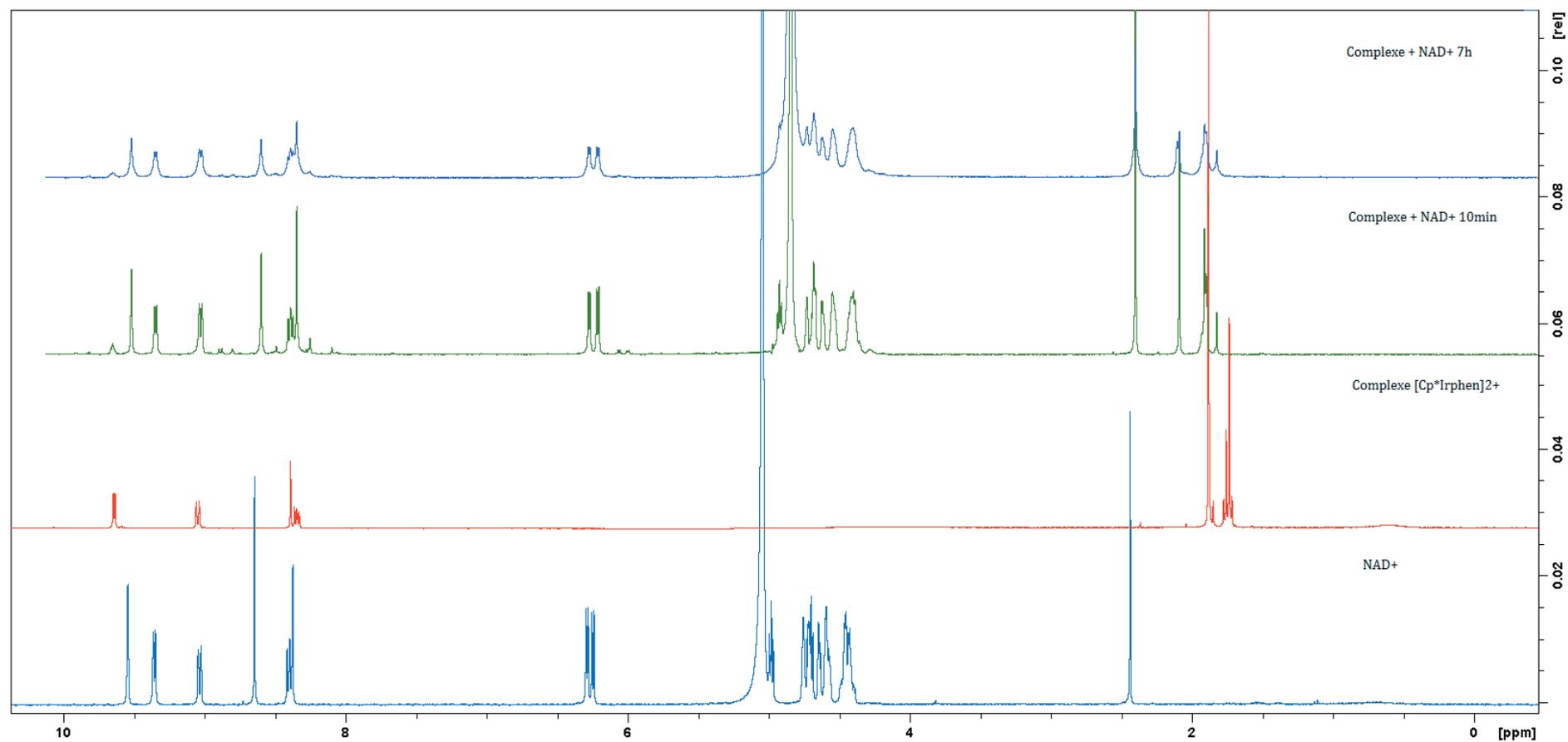


Figure 12 Spectres RMN ^1H du cofacteur oxydé NAD^+ , du complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ et de leur mélange après 10 min (en vert) et 7 h (en bleu nuit)

On peut constater l'absence d'évolution majeure du spectre après 7 h de contact, sans apparition de nouveaux pics. L'évolution de la largeur et de l'intensité des pics est due à une modification des shims et du lock du signal au cours du temps. Les signaux du complexe sont faibles à cause de sa faible concentration. Il n'y a pas de référence dans le milieu, cependant, les intégrations relatives des deux composés et leur évolution entre le début de la réaction puis après 7 heures de contact sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 Intégrations relatives des signaux du complexe et du NAD⁺ pour leur mélange après 10 min et 7 h

Composé	Signal	10 min	7 h
Complexe	H (Cp*)	15,0	15,0
	H 	Indéterminable	Indéterminable
	H 		
	H 		
	H 	1,4	1,4
NAD ⁺	H 	2,0	2,0
	H 		
	H 	0,8	0,8
	H 	1,0	1,0
	H 	0,8	0,8
	H 	0,8	0,8

Il n'y a pas d'évolutions des intégrations relatives entre les composés montrant ainsi qu'il ne semble pas y avoir eu de modification du cofacteur ou du complexe.

Par conséquent, le complexe organométallique ne présente pas de réactivité sur le NAD⁺. Il était nécessaire de s'en assurer avant de mettre en œuvre un quelconque test de catalyse hybride pour lequel NAD⁺ doit être réduit par l'enzyme concomitamment à l'oxydation du substrat. On peut donc

évaluer l'activité du complexe sur la transformation du NADH en NAD⁺, réaction de régénération que nous désirons appliquer au système hybride.

2.2 Oxydation stœchiométrique de NADH en NAD⁺

Le cofacteur nicotinamide réduit (NADH) et le complexe ont été mis en solution dans de l'eau milliQ en quantité stœchiométrique dans un tube RMN d'usage classique. Le spectre a été enregistré après 20 minutes de contact à 37 °C avec une manipulation WET (manipulation RMN ¹H permettant d'éliminer le signal de l'eau). Le spectre obtenu est présenté en Figure 13.

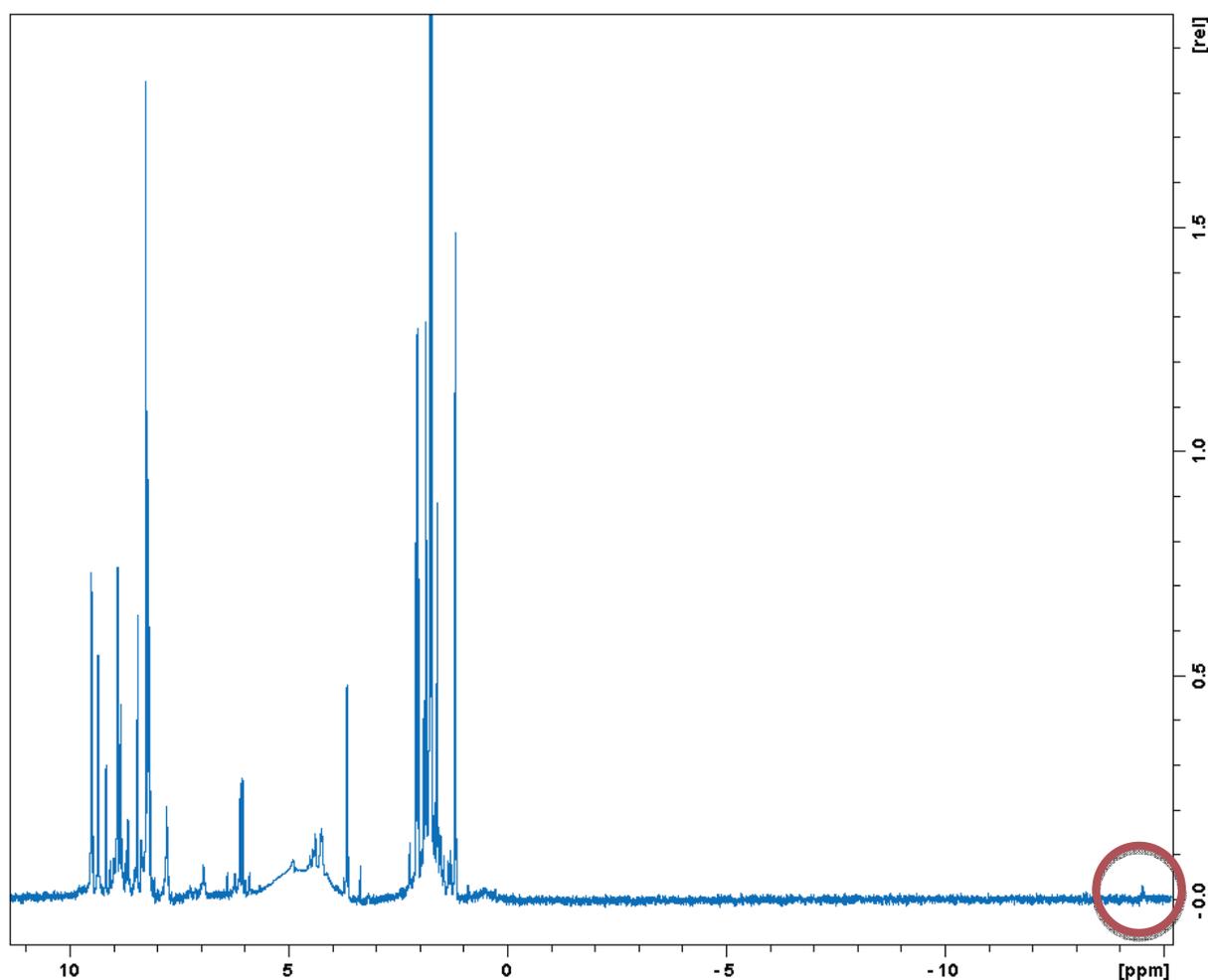


Figure 13 ¹H RMN (méthode WET) de la régénération du NAD⁺ à partir du NADH (0,5 mM) avec le complexe [Cp*Ir(phen)(H₂O)]²⁺ (0,5 mM)

On observe de nombreux nouveaux signaux dans les zones d'intérêt, autour de 1,5 ppm pour le Cp* et dans la zone des aromatiques 8 ppm-10 ppm. La comparaison entre le spectre obtenu avec les spectres des trois composés NADH, NAD⁺ et le complexe dans la zone des aromatiques (de 8 ppm à 10 ppm) est présentée en Figure 14.

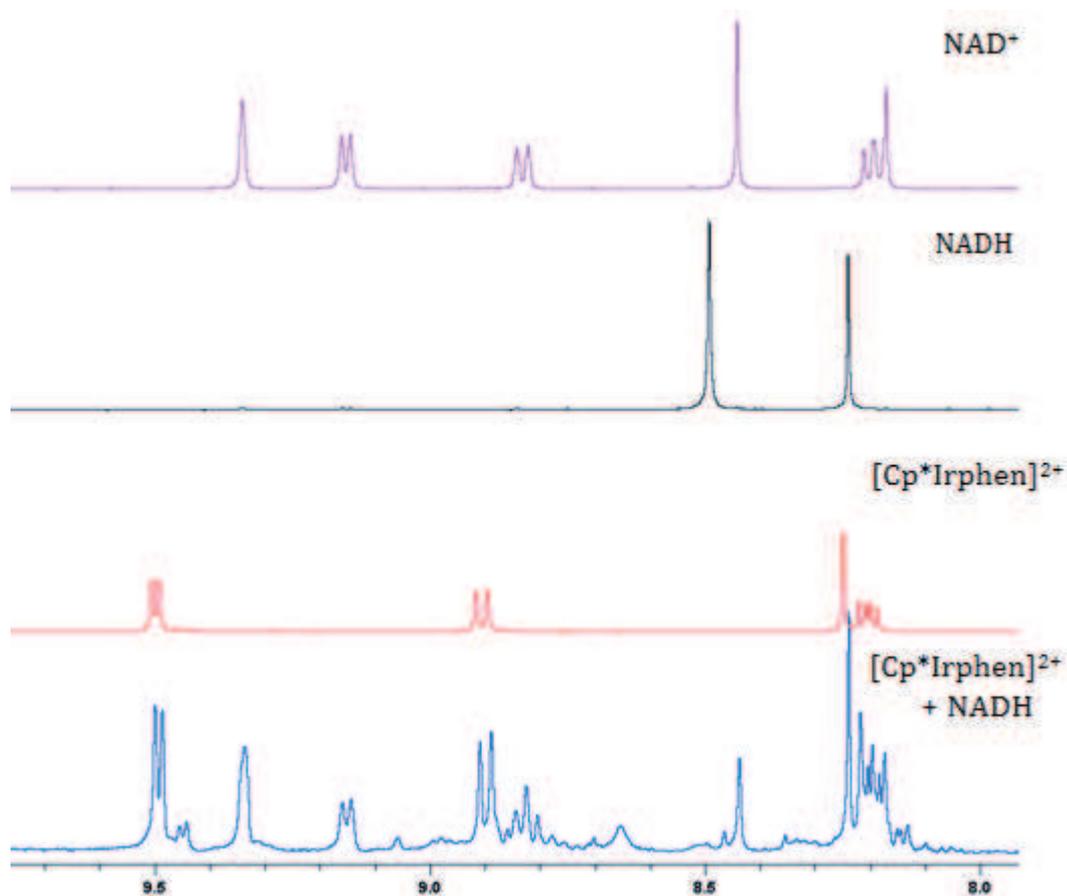


Figure 14 ^1H RMN des composés NAD^+ (en mauve) NADH (en noir), complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (en rouge) et de la solution stœchiométrique NADH + complexe après 20 min de contact à 37°C dans la zone aromatique

Dans le spectre bleu (complexe organométallique + NADH) on retrouve les signaux du complexe, les signaux du NAD^+ et aucun des deux signaux correspondant au NADH (8,2 ppm et 8,5 ppm). Ce spectre laisse supposer que le NADH a été totalement converti mais en l'absence de référence, il n'est toutefois pas possible de quantifier parfaitement la sélectivité de la réaction.

Un signal supplémentaire attire tout particulièrement notre attention avec un pic très blindé à - 14,5 ppm, dans la zone où les hydrures métalliques sont fréquemment rencontrés. Ce signal peut nous donner un indice sur le mécanisme réactionnel suivi à partir du complexe de départ.

Après 20 minutes de réaction entre le NADH et le complexe à 37°C , la totalité du NADH serait ainsi transformée avec une sélectivité qui semble correcte en NAD^+ . Nous reviendrons un peu plus tard sur la formation possible d'un hydrure d'iridium, information précieuse pour l'étude mécanistique. La

présence d'une forme hydrure d'iridium détectée en RMN ^1H a déjà été mentionnée dans la littérature.⁷

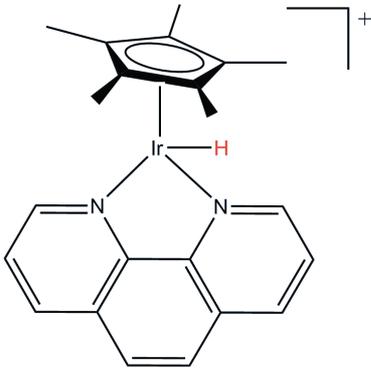
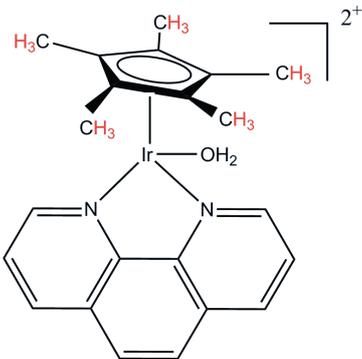
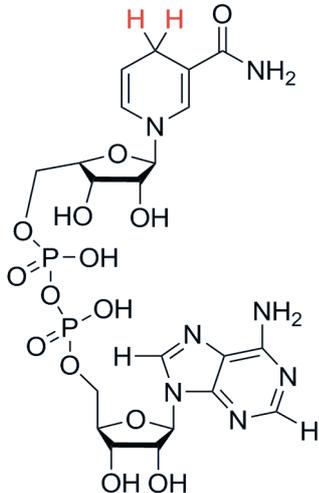
Après avoir validé la capacité du complexe à régénérer de manière stœchiométrique le NAD^+ , voyons si la quantité de complexe à employer peut être minimisée de façon à valider son action catalytique.

2.3 Conditions catalytiques

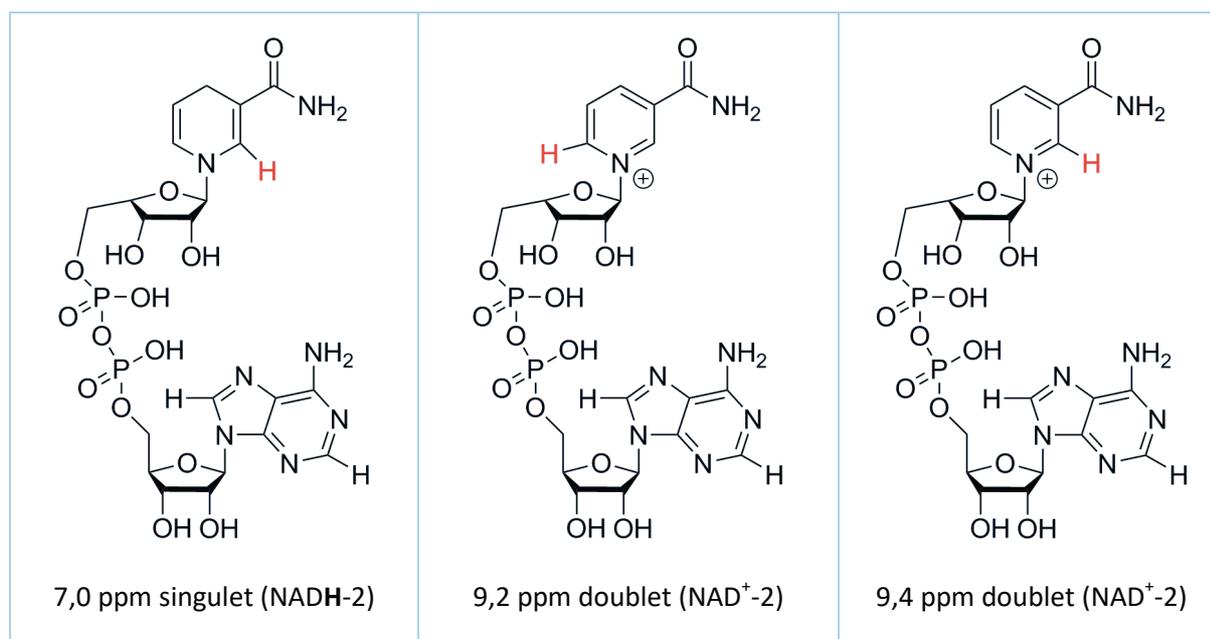
Afin d'explorer le potentiel catalytique du complexe d'iridium, ce dernier est introduit à hauteur de 10 % molaire par rapport au NADH. L'analyse est effectuée, comme ci-dessus, à l'aide de l'acquisition de spectres RMN ^1H à différents intervalles de temps. Pour tous les tests catalytiques, une solution d'acétate de strontium à 0,7 mM dans du D_2O est utilisée comme étalon externe.

Deux signaux du NADH et deux signaux du NAD^+ ainsi que le signal du Cp^* pour le complexe ont été choisis comme références pour quantifier les espèces. On pourra également intégrer le signal dans la zone des hydrures, qui nous informera sur l'apparition d'un éventuel intermédiaire réactionnel. Le détail des signaux avec leurs déplacements et leurs multiplicités est reporté dans le Tableau 2.

Tableau 2 Déplacements des signaux utilisés comme références (atomes d'hydrogène représentés en rouge) pour les quantifications ^1H RMN

Signaux étudiés pour les quantifications		
 <p>- 14 ppm singulet</p> <p>Composé proposé avec une structure hydrure</p>	 <p>1,8 ppm singulet</p>	 <p>2,8 ppm deux doublets système AB (NADH-1)</p>

⁷ Millett, A. J.; Habtemariam, A.; Romero-Canelon, I.; Clarkson, G. J.; Sadler, P. J. *Organometallics* **2015**, *34* (11), 2683–2694.



On peut donc obtenir la concentration de chaque composé en fonction du temps. L'évolution des concentrations des composés pour les conditions décrites en début de paragraphe est proposée dans le graphique en Figure 15.

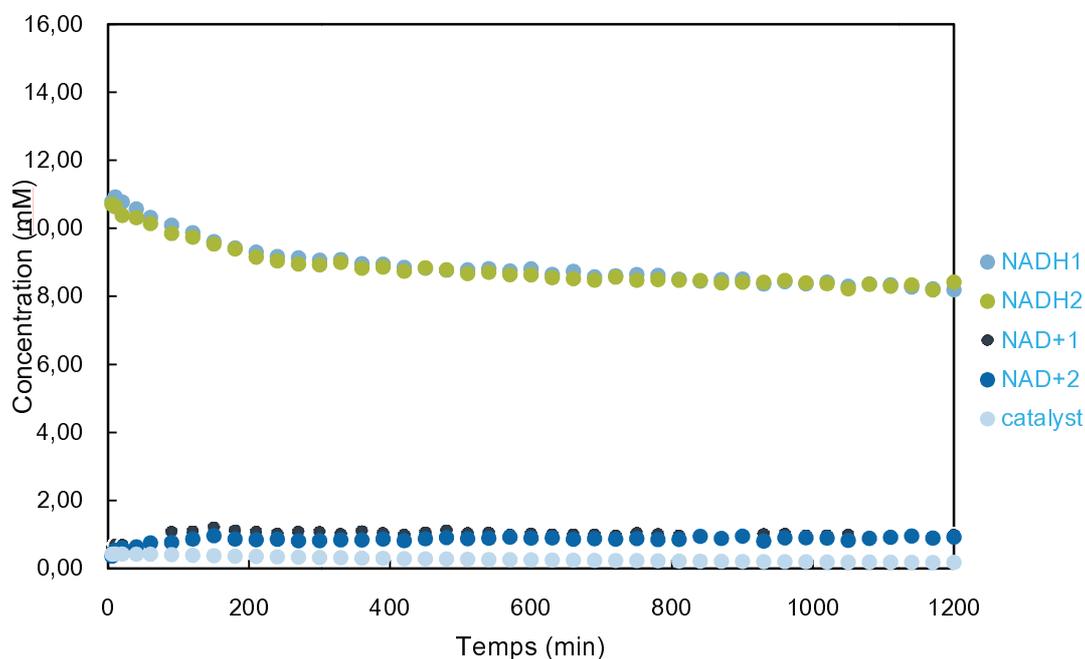


Figure 15 Régénération du NAD⁺ à partir du NADH avec le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ en conditions catalytiques

Les points gris correspondent à l'intégration du signal du Cp* à 1,8 ppm, il intègre donc théoriquement la totalité des espèces organo-iridium.

On retrouve la même concentration quel que soit le signal choisi pour le cofacteur oxydé (NAD^{+} -1 et NAD^{+} -2) ou le cofacteur réduit (NADH -1 ou NADH -2) ce qui nous permet de valider notre méthodologie de quantification par RMN ^1H .

Sur le tout premier spectre (enregistré après environ 5 minutes de contact entre le complexe et le NADH) on observe déjà la présence de NAD^{+} et l'on note également l'apparition d'une faible proportion de signal hydrure. Pendant la réaction, on observe la formation du NAD^{+} et la consommation parallèle de NADH avant une stabilisation des concentrations après 150 minutes de réaction (Figure 15). La Figure 16 propose un zoom de la Figure 15 entre 0 et 1 mM en ordonnées, ce qui nous permet d'apprécier plus en détail l'évolution des concentrations.

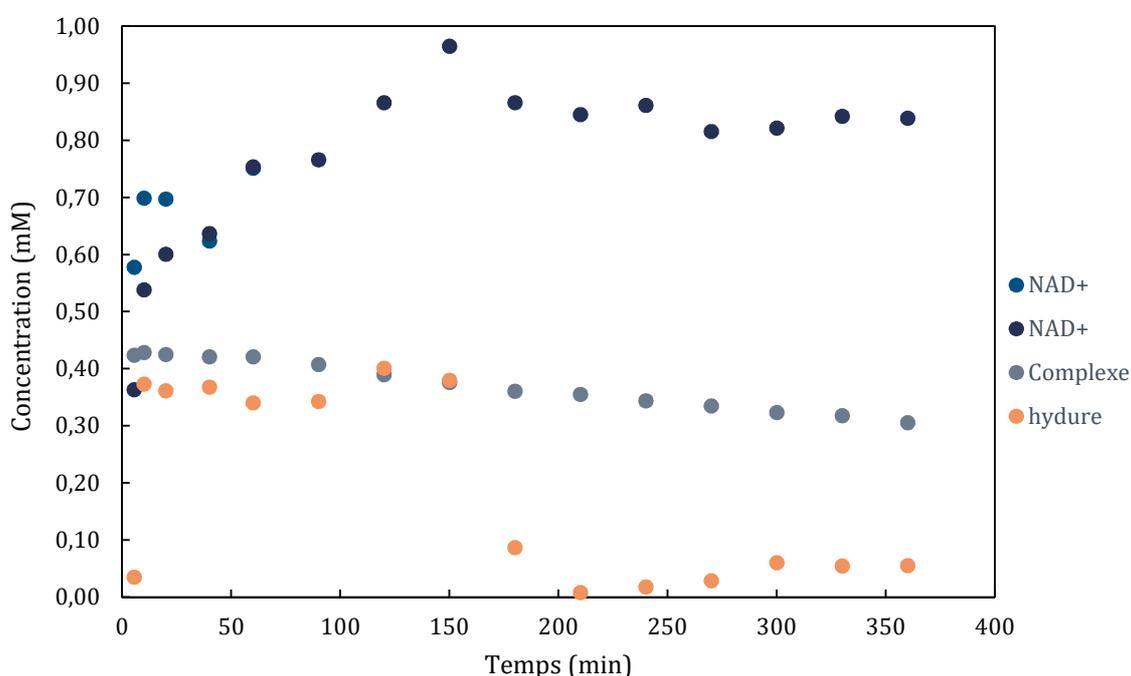


Figure 16 Régénération du NAD^{+} à partir du NADH avec le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ en conditions catalytiques -zoom dans la gamme de concentrations 0 – 1 mM

Il existe une incertitude sur les valeurs numériques mesurées. Celle-ci est due au « bruit » présent lors de l'acquisition du spectre, qui génère une erreur estimée à $\pm 0,05$ mM. La concentration en NAD^{+} est évaluée grâce à l'intégration de deux signaux. Les concentrations calculées, indiquées en bleu et en violet sur la Figure 16, sont différentes jusqu'à 60 minutes de réaction mais comprises dans l'erreur estimée. Après 60 minutes, les concentrations calculées avec les deux signaux sont identiques.

Sur le zoom (Figure 16) correspondant à la gamme de concentration 0 -1 mM, on peut voir l'espèce hydrure (points orange) apparaître très rapidement dans une gamme de concentrations similaire à celle du complexe d'iridium ($\approx 0,40$ mM). Puis, à partir de 150 minutes de réaction, l'intensité du

signal correspondant à cet hydrure diminue jusqu'à se retrouver dans la limite de détection. La concentration en complexe globale diminue lentement au cours du temps, traduisant donc une possible et lente dégradation du complexe. On peut également remarquer que la disparition de l'espèce hydrure après 150 minutes concorde avec la stabilisation de la concentration du NAD^+ , et donc l'arrêt de sa production. On peut donc supposer une relation directe entre la formation de NAD^+ et la présence de cet intermédiaire hydrure, vraisemblablement un intermédiaire clé dans le mécanisme de régénération du cofacteur et du complexe actif.

A partir de ces données, les TurnOver Frequency (TOF) et TurnOver Number (TON) peuvent être calculés. Ils décrivent la capacité du complexe organométallique à effectuer la réaction désirée et sont calculés d'après les équations suivantes :

$$TON = \frac{\text{mole de produit désiré}}{\text{mole de catalyseur}} = \frac{C_{\text{NAD}^+}}{C_{[\text{CpIrphen}]^{2+}}}$$
$$TOF (\text{min}^{-1}) = \frac{TON}{\text{temps}}$$

Équation 1 Equations pour le calcul du TON et du TOF

Dans notre étude, nous calculerons le TON à 150 minutes et le TOF à 10 minutes.

Pour le test catalytique précédent, le TOF et le TON sont respectivement de $8,7 \pm 0,4$ et $2,4 \pm 0,4 \text{ min}^{-1}$.⁸ On peut en conclure que la réaction est effectivement « catalytique » car une mole de complexe est en mesure de régénérer plus d'une mole de NAD^+ ($TON > 1$). Une telle valeur traduit néanmoins une certaine faiblesse de l'activité du complexe.

2.4 Discussion

La réaction équimolaire entre NADH et $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ produit du NAD^+ très rapidement dans les conditions testées avec probablement l'apparition d'une espèce hydrure dans le milieu (déplacement de -14,5 ppm en RMN ^1H), espèce déjà observée par Sadler *et coll.*⁹ et attribuée à un hydrure d'iridium. Le déplacement du signal est dans leur cas de -11 ppm dans un solvant deutéré différent (D_2O dans notre cas et méthanol deutéré, MeOD-d^4 , dans le cas de Sadler).

⁸ On a appliqué la méthode algébrique pour le calcul d'incertitude : si $X = a/b$ alors $\Delta X = (a.\Delta b + b.\Delta a)/b^2$

⁹ Liu, Z.; Deeth, R. J.; Butler, J. S.; Habtemariam, A.; Newton, M. E.; Sadler, P. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52 (15), 4194–4197.

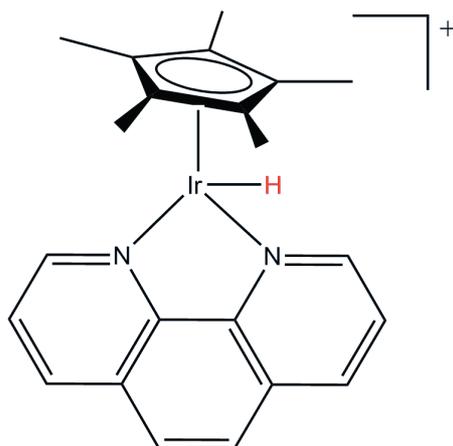


Figure 17 Forme hydrure du complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})\text{H}]^+$ proposée par Sadler *et coll.*

Lorsque le complexe est en contact avec le NADH, on peut également observer de nouveaux pics à 9,45, 8,85 et 8,15 ppm légèrement blindés de 0,05 ppm par rapport aux pics des protons de la phénantroline du complexe de départ (Figure 14). Les intégrations relatives de l'hydrure à 1 proton et des protons en alpha des azotes de la phénantroline (9,45 ppm) à 2 protons peuvent indiquer que ces signaux aromatiques blindés sont ceux de la phénantroline portée par le complexe hydrure. En effet, lorsqu'un hydrure se situe à la place du ligand aqua sur le complexe, il induit une augmentation de la densité électronique globale du complexe, ce qui aura pour effet de blinder les signaux.

Pour examiner cette hypothèse, nous pouvons exploiter la RMN 2D NOESY comme nous l'avons fait dans la Figure 7 pour tenter d'observer la corrélation spatiale entre les ligands, et spécifiquement entre l'hydrure et la phénantroline ou entre l'hydrure et le cyclopentadiényle. Le spectre obtenu est reporté dans la Figure 18.

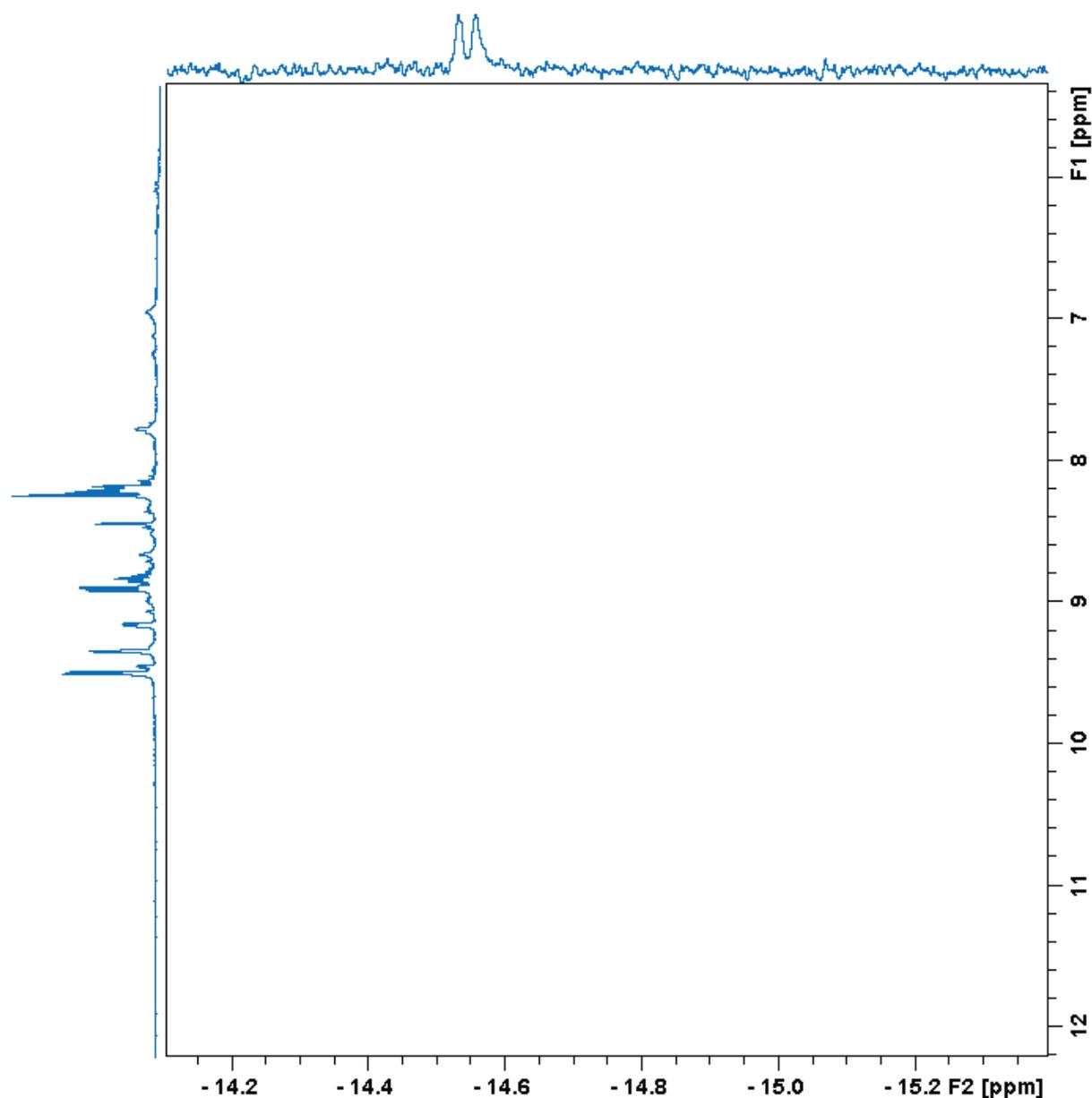


Figure 18 RMN 2D NOESY du milieu réactionnel $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} + \text{NADH}$ après 3 h de réaction à 37 °C

Le signal pour l'hydrure obtenu dans le spectre est sous la forme d'un doublet. Lors de cette manipulation, la forme des pics situés dans les zones extrêmes du spectre peuvent être déformés. Le signal de l'hydrure dans un spectre RMN ¹H une dimension est bien sous la forme d'un singulet.

D'après le spectre 2D NOESY obtenu, on n'observe cependant pas de corrélations spatiales entre le pic de l'hydrure à -14,50 ppm et le pic à 9,45 ppm. Deux hypothèses peuvent justifier cette observation : soit l'espèce, qui est un intermédiaire, a une durée de vie trop faible pour qu'on puisse observer une corrélation spatiale en RMN 2D, soit l'iridium est trop gros et éloigne trop l'hydrure du

Cp* et de la phénantroline. Des expériences supplémentaires en RMN 2D, avec des ajustements sur la séquence pourrait permettre d'obtenir d'avantages d'informations.

Si on fait le bilan de ces tests, lorsque le complexe est en quantité catalytique par rapport au NADH, on observe la formation de NAD⁺ et on détecte une espèce intermédiaire hydrure d'iridium dont la présence semble corrélée à la formation de NAD⁺. Un arrêt assez brutal de la réaction est observé concomitamment à la disparition du signal correspondant à l'hydrure après 150 minutes, avec arrêt de la production de NAD⁺, alors que les analyses RMN ne montrent pas de dégradation avancée des réactifs (complexe et NADH). Des valeurs relativement faibles de TON sont ainsi obtenues (de l'ordre de 2). Toutes ces observations nous font nous interroger quant aux conditions optimales d'activité du complexe ainsi que sur le mécanisme de régénération.

Les résultats obtenus sont difficilement comparables avec la littérature car la majorité des auteurs étudient la réaction inverse, c'est-à-dire la réduction du NAD⁺ en NADH avec des complexes organométalliques à base de rhodium, de ruthénium et moins souvent d'iridium. Cette réaction est aussi un transfert d'hydrure mais ce transfert est généré par la réduction de formiate HCOO⁻ en CO₂. En conséquence, le mécanisme est différent et nous ne pouvons comparer l'activité des catalyseurs au complexe [Cp*Ir(phen)(H₂O)]²⁺ ici étudié.^{10,11}

A notre connaissance, seule l'équipe de Sadler a récemment rapporté l'activité de différents catalyseurs d'iridium pour la régénération de NAD⁺, mais en l'absence de réaction enzymatique couplée.¹² Les complexes ont la forme présentée en Figure 19.

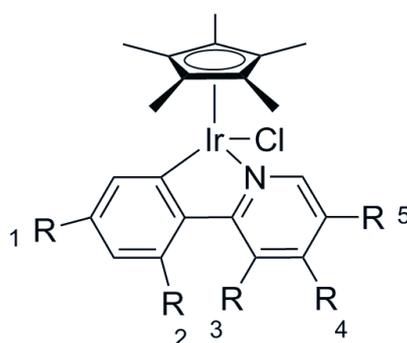


Figure 19 Structures des complexes étudiés par l'équipe de Sadler pour la régénération du NAD⁺

Les complexes avec une structure de type [C,N] sont neutres avec un atome d'iridium au degré d'oxydation (+III). Ils sont moins solubles en solution aqueuse, l'ajout de méthanol en faible quantité

¹⁰ Haquette, P.; Talbi, B.; Barilleau, L.; Madern, N.; Fosse, C.; Salmain, M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9 (16), 5720–5727.

¹¹ Canivet, J.; Süß-Fink, G.; Štěpnička, P. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 2007 (30), 4736–4742.

¹² Millett, A. J.; Habtemariam, A.; Romero-Caneln, I.; Clarkson, G. J.; Sadler, P. J. *Organometallics* **2015**, 34 (11), 2683–2694.

(0,5%) a permis la solubilisation de ces complexes et la mesure de leur activité. Dans cette étude, les complexes portent soit des groupements électrodonneurs, soit des groupements électroattracteurs.

Les complexes permettent tous une transformation catalytique de NADH en NAD⁺, cependant les complexes avec un groupement électroattracteur montrent une plus grande activité. Le complexe portant un groupement hydroxyle en R₁ et des hydrogènes comme autres groupements R est ainsi celui montrant la plus grande activité. La proposition mécanistique de Sadler *et coll.* avec le complexe montrant les meilleures performances dans leur cas est présentée Figure 20. Ce mécanisme avait déjà été proposé par cette équipe est reporté précédemment dans ce chapitre en Figure 10.

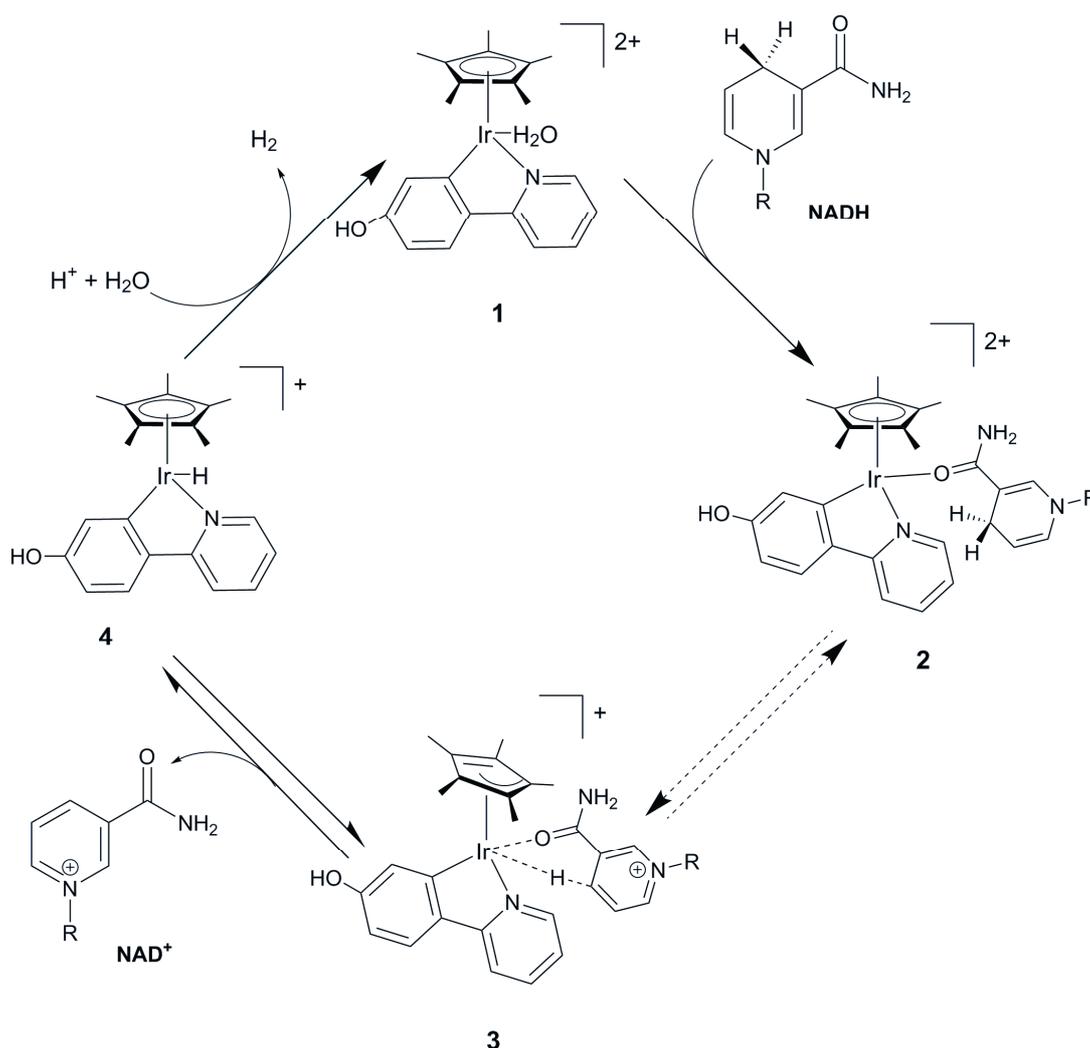


Figure 20 Mécanisme proposé par Sadler *et coll.* pour la régénération du NAD⁺ avec le complexe fonctionnalisé par un groupement hydroxyl

L'activité de ce complexe pour la formation de NAD⁺ est caractérisé par un TON de 28 et un TOF de 3,2 min⁻¹). La proposition d'explication de cette augmentation d'activité est le rôle joué par le groupement OH pour la formation de l'adduit Ir-NADH (2 et 3 de la Figure 20) qui est l'étape limitante selon eux.

D'après cette proposition de mécanisme, la réaction est accompagnée de la consommation d'un proton et de dégagement de dihydrogène. Ces observations ont également été faites dans notre cas.

Dégagement de H₂

Le cycle catalytique fait intervenir le dégagement de dihydrogène comme étape clé de régénération du complexe aqua d'iridium, espèce active pour l'oxydation de NADH en NAD⁺. Nous avons donc expérimentalement recherché à détecter la formation de dihydrogène. Le dégagement de H₂ a été mesuré en effectuant une réaction de régénération dans un eppendorf fermé, puis le ciel du réacteur a été analysé par GC-TCD. Le chromatogramme est présenté en Figure 21.

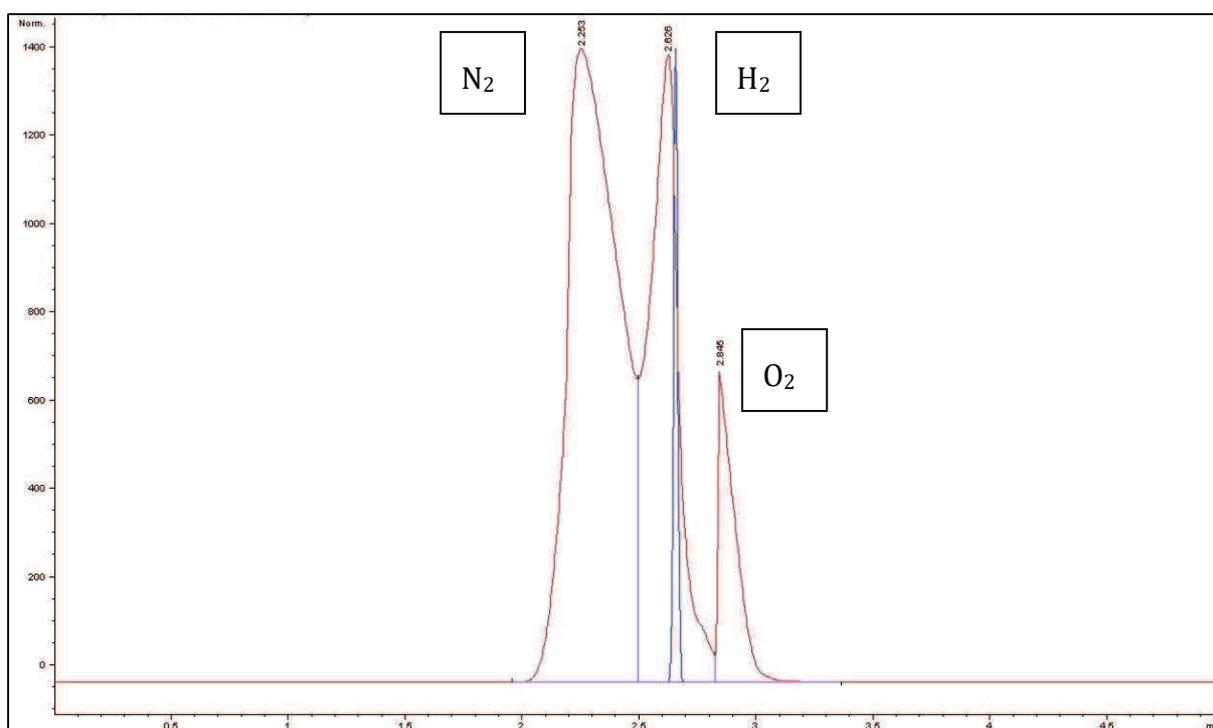


Figure 21 Chromatogramme obtenu par GC-TCD du « ciel » du réacteur après une réaction d'une heure dans un réacteur fermé hermétiquement

On constate la présence de dioxygène, de dihydrogène et d'azote. Les trois gaz ont été séparés puis détectés. La présence de dioxygène et d'azote s'explique par le fait que la réaction a lieu en présence d'air. La détection de dihydrogène montre une production de H₂ lors de la régénération du NAD⁺, ce qui conforte une hypothèse du mécanisme proposé.

Variation du pH et ajout d'acide

Selon le mécanisme proposé, on peut voir que le pH du milieu aurait une influence sur la réaction. En effet, un pH acide favoriserait le retour à l'espèce active à partir de l'espèce hydrure. La réaction

ayant lieu dans des tubes RMN, la mesure du pH et de son évolution n'est pas aisée. Pour s'affranchir de cette difficulté, on peut ajouter 2 μL d'acide chlorhydrique dans le tube lorsqu'on n'observe plus d'évolution des concentrations des cofacteurs, réduit et oxydé. On pourra ensuite observer si l'ajout de proton dans le milieu aura eu un effet sur la réaction.

Ce volume d'acide chlorhydrique concentré a été choisi pour ne pas trop impacter le volume du système et donc ne pas faire varier significativement les concentrations des différentes espèces. Le tube est réinséré dans le spectromètre et l'acquisition à intervalles de temps réguliers des spectres reprend. L'évolution des concentrations des espèces est montrée en Figure 22.

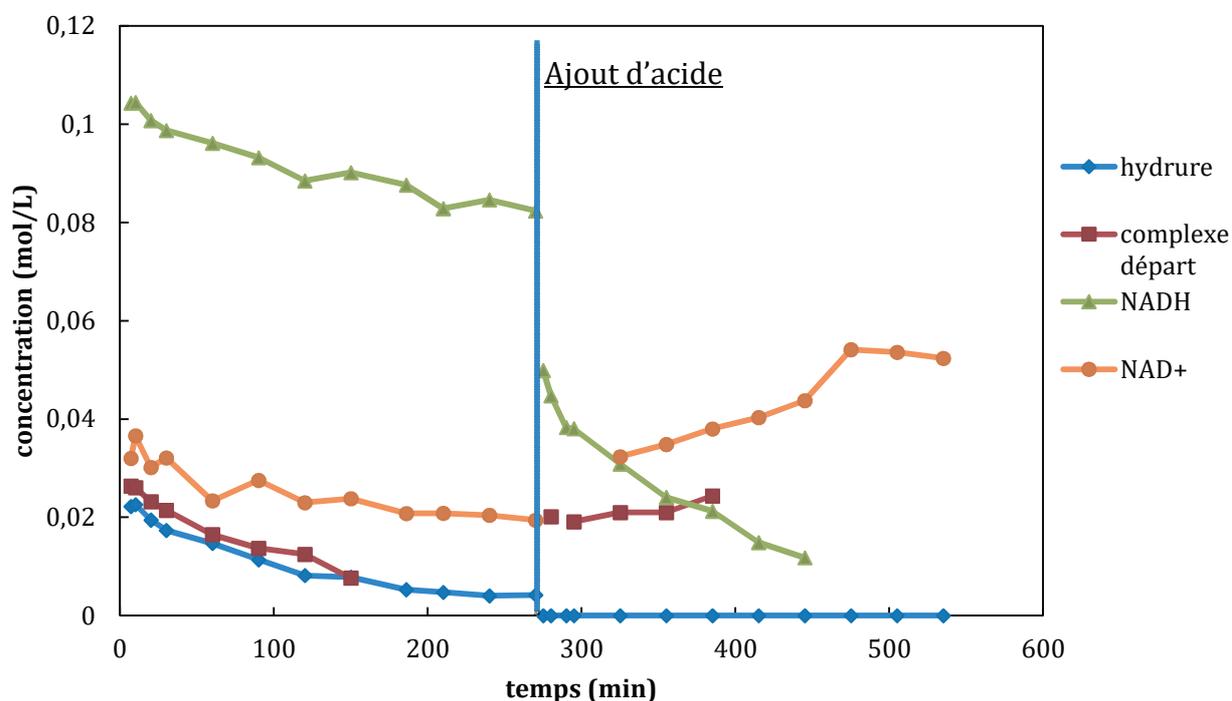


Figure 22 Profils des concentrations en régénération du NAD^+ à partir de NADH (0,1 M) avec le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (0,25 M) à 37 °C suivie par ^1H RMN avec un ajout d'acide chlorhydrique (2 μL à 0,1 M) à 280 min

Tout d'abord, on peut voir qu'après l'ajout d'acide on ne détecte plus de signal hydruure par RMN ^1H . En parallèle, la reprise de la production de NAD^+ est clairement observée. Cela montre que les protons amenés par l'acide chlorhydrique ont permis de « relancer » le cycle catalytique et d'augmenter la réactivité du complexe hydruure de sorte que sa durée de vie soit très courte, et qu'il ne soit plus détectable par RMN ^1H .

Selon le mécanisme proposé, les protons disponibles en plus large quantité grâce à l'acide ajouté permettraient à l'espèce hydruure $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H})]^+$ de régénérer l'espèce active $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$

pour la réaction. Par conséquent, la protonation étant favorisée, on n'observe plus l'hydrure par RMN ^1H car sa durée de vie dans la solution est trop courte.

Durant les 150 premières minutes, l'intensité du signal du Cp^* correspondant au complexe de départ diminue (Figure 22). Sur les spectres, on observe une démultiplication des signaux entre 1,5 ppm et 2,3 ppm. En conséquence de l'apparition de ces nombreux signaux, l'intégration du signal correspondant au complexe de départ devient difficile. Ces pics peuvent être attribués à de nouvelles formes de complexes avec un ligand Cp^* . Après l'ajout de l'acide, le signal à 1,8 ppm réapparaît, et celui-ci est observé jusqu'à atteindre la concentration ajoutée en début de réaction. Ceci suggère que le complexe de départ, espèce active pour la formation de NAD^+ à partir de NADH , est disponible, dans son intégralité, dans la solution.

Enfin, la disparition de NADH et la formation de NAD^+ sont également observées avec une déformation des signaux du NADH ne permettant plus une intégration de ceux-ci après 450 minutes de réaction. Si on calcule, à 450 minutes, la somme des concentrations du NADH et du NAD^+ , on obtient 0,055 M tandis que la concentration initiale en NADH est d'environ 0,1 M. Cette diminution de concentration peut être attribuée à une dégradation d'un ou des deux cofacteurs dans ces conditions opératoires.

On peut donc conclure que la réaction catalytique de formation de NAD^+ est favorisée à des pH acides. Dans les expériences décrites précédemment, le ralentissement observé serait dû à un déficit en protons et donc l'étape cinétiquement déterminante serait la protonation de l'hydrure d'iridium. Dans le cas d'une solution avec un pH acide, le complexe de départ étant présent, on peut donc penser que l'étape cinétiquement déterminante ne serait plus cette protonation mais la formation de l'adduit iridium- NADH comme proposé par l'équipe de Sadler.

Compte-tenu de nos observations et des résultats de la littérature, il nous paraît indispensable d'approfondir dans la globalité l'étude mécanistique de la réaction catalytique entre NADH et le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ pour identifier les paramètres régissant la réactivité et améliorer *in fine* l'activité du système. L'espèce hydrure semble déterminante dans ce cycle catalytique et nous considérons d'égale importance non seulement l'étape d'oxydation de NADH en NAD^+ , mais aussi l'étape de régénération de l'espèce supposée active $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ à partir de l'espèce hydrure $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})\text{H}]^+$. Cette dernière étape n'a fait l'objet d'aucune attention particulière, dans les travaux de Sadler notamment, alors que nous estimons par nos premiers résultats qu'elle est déterminante. Une étude de modélisation moléculaire constitue donc une approche intéressante pour identifier les

paramètres critiques mis en jeu au sein de la totalité des étapes élémentaires impliquées dans le cycle catalytique.

IV Etude du mécanisme

L'étude théorique du mécanisme s'est tout d'abord focalisée sur la régénération du complexe initial $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ à partir de l'hydrure $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H})]^+$ détecté expérimentalement. Celle-ci est présentée dans cette partie en imbriquant résultats de l'étude théorique et observations expérimentales.

1 Présentation des conditions de calculs pour l'étude théorique

Notre étude théorique se propose de définir les grands paramètres gouvernant la réaction telles que la structure des états de transition et la valeur des énergies d'activation par une approche basée sur des méthodes de calcul de chimie quantique. L'obtention de ces grandeurs observables nécessite une détermination fiable de la structure électronique du système étudié, ce qui revient à résoudre l'équation de Schrödinger. Cette dernière est trop complexe pour pouvoir être résolue de manière analytique pour des systèmes impliquant plusieurs noyaux et plusieurs électrons. Il est donc nécessaire de recourir à plusieurs approximations et concepts visant à obtenir une solution fiable tout en gardant des temps de calculs relativement courts. La Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (Density Functional Theory, DFT en anglais) est un bon compromis entre le temps de calcul et la précision.

1.1 Equation de Schrödinger et approximations de la DFT

L'équation de Schrödinger (Équation 2) indépendante du temps, permet d'obtenir l'énergie E de tout système polyatomique à N électrons et M atomes :

$$\hat{H}|\psi(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_N, \bar{R}_1, \bar{R}_2, \dots, \bar{R}_M)\rangle = E |\psi(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_N, \bar{R}_1, \bar{R}_2, \dots, \bar{R}_M)\rangle$$

Équation 2 Equation de Schrödinger

où \hat{H} est l'hamiltonien moléculaire du système et ψ la fonction d'onde. Dans l'impossibilité de résoudre directement cette équation de manière analytique pour un système polyatomique, des approximations successives sont appliquées. La première approximation est celle de Born-Oppenheimer. Son principe repose sur la décorrélation du mouvement des électrons et des noyaux. Dans ce cas, la position des noyaux intervient en tant que paramètre dans l'hamiltonien électronique \hat{H}_{elec} .

Cette approximation de Born Oppenheimer se justifie par la différence de vitesse des électrons d'une part et des noyaux d'autre part due à leur différence de masse. Les électrons s'adaptent alors instantanément à la position des noyaux et il faut alors résoudre l'Équation 3.

$$\hat{H}_{elec}|\Psi_{elec}\rangle = E_{elec}|\Psi_{elec}\rangle$$

Équation 3 Equation de Schrödinger simplifiée

La valeur de l'énergie totale E_{tot} se détermine ensuite par la somme de l'énergie électronique E_{elec} et la répulsion nucléaire E_{nn} qui est considérée comme constante.

$$E_{tot} = E_{elec} + E_{nn}$$

Équation 4 Equation de l'énergie totale après l'approximation de Born Oppenheimer

La simplification permise par l'approximation de Born-Oppenheimer ne résout cependant pas la question de la résolution de l'équation de Schrödinger. Par une approche numérique et l'utilisation d'une méthode itérative guidée par le principe variationnel, il est possible d'obtenir une fonction d'onde électronique approchée. Le principe variationnel utilisé ici est celui proposé par Ritz *et coll.* Il cherche à se rapprocher de la fonction d'onde réelle en utilisant une fonction d'onde d'essai et en minimisant l'énergie. Toutefois il est impossible de calculer la fonction d'onde exacte pour un système poly-électronique, et des approximations supplémentaires sont nécessaires.

L'approximation d'Hartree-Fock (HF) décrit une fonction d'onde électronique à N électrons $\Psi(e_1, e_2, \dots, e_N)$ par un produit antisymétrique de N fonctions d'onde monoélectroniques $\Psi_i(e_j)$. Dans le cadre de ce formalisme, par comparaison avec un calcul classique, un terme énergétique supplémentaire apparaît appelé terme d'échange qui est dû au principe de Pauli. Ce dernier impose l'antisymétrie de la fonction d'onde par rapport à l'échange des électrons. L'énergie obtenue par cette méthode est systématiquement supérieure à l'énergie exacte du système. Cette différence est appelée énergie de corrélation. Plusieurs formalismes permettent de calculer ce terme énergétique de manière plus ou moins exacte et plus ou moins rapide. La Théorie de la fonctionnelle de la densité présente un bon compromis entre le temps de calcul et la précision.

La Théorie de la Fonctionnelle de la Densité est une méthode très différente de celle utilisée *via* l'approximation de Hartree-Fock. Elle relie la densité électronique ρ du système à l'énergie de celui-ci à l'aide d'une fonction de fonction appelée fonctionnelle. La densité du système est évaluée puis, de la même façon que pour Hartree-Fock, le principe variationnel est appliqué afin de trouver la densité qui donne l'énergie minimum du système. Cette énergie calculée comprend un terme d'échange et un terme de corrélation entre les orbitales mais uniquement de manière approchée.

1.2 Méthode utilisée

Afin d'obtenir l'énergie du système la plus juste possible, nous avons utilisé une méthode hybride entre l'HF et la DFT en sommant les deux termes et en enlevant la partie échange calculée par la DFT à l'aide d'un facteur choisi en fonction de la méthode.

La fonctionnelle que nous utilisons pour nos calculs est B3LYP, c'est-à-dire que la fonctionnelle de la DFT (paramétrée par Lee Yang Par) est associée à un calcul Hartree Fock afin d'avoir une estimation précise à la fois des énergies d'échange et de corrélations comme le résume la Figure 23.

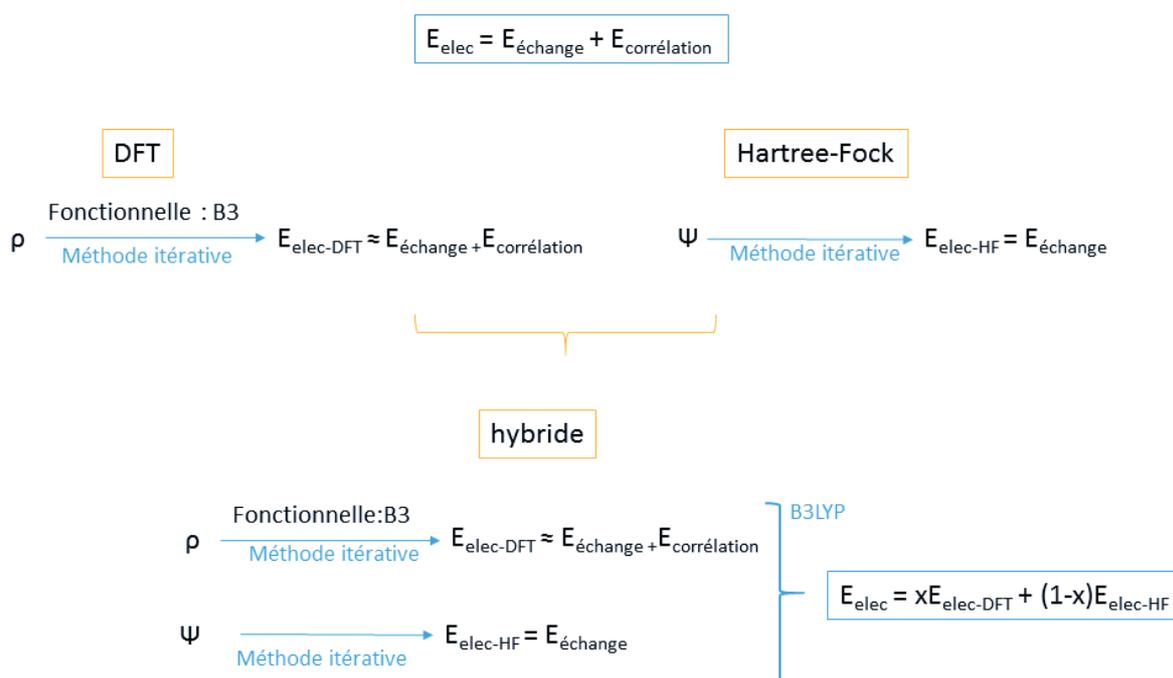


Figure 23 Principe de la méthode hybride B3LYP

Même si la fonctionnelle B3LYP donne une erreur moyenne de 5 kcal.mol^{-1} sur les complexes d'iridium car elle ne dispose pas d'un terme correctif de la dispersion,¹ celle-ci a été sélectionnée car elle nous permet un bon compromis entre précision et temps de calcul nécessaire.

Après avoir choisi la méthode de calcul il faut maintenant sélectionner les fonctions de bases décrivant les densités électroniques. Il existe différentes fonctions de bases, et le choix est crucial car il influe sur le temps de calculs et la précision. Dans notre système, nous utiliserons la fonction de base 6-31++G(d,p).

Pour les atomes lourds, le nombre d'électrons est important ce qui ralentit les calculs. De plus des effets relativistes doivent être inclus dans le calcul pour décrire les électrons 1s. D'autre part ces électrons de cœur ne participent pas aux liaisons chimiques. On peut donc traiter uniquement les

électrons de valences de manière explicite et remplacer les électrons de cœur par le champ ou le potentiel électrostatique qu'ils génèrent.

2 Etude combinée DFT-expérimental du cycle catalytique autour du complexe d'iridium

2.1 Étude DFT

La DFT nous permet de déterminer la géométrie d'un composé en phase gaz en faisant varier la géométrie. En partant d'une géométrie, le programme va déplacer les atomes afin de trouver le minimum énergétique. Dans le cas où plusieurs isomères sont possibles, ils sont tous optimisés et le composé ayant l'énergie la plus faible sera considéré comme le plus stable et donc le plus susceptible d'être présent dans le milieu. Nous avons vu que la régénération du complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ à partir de l'intermédiaire $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H})]^+$ n'a fait l'objet d'aucune attention particulière jusqu'à présent dans la littérature, car considérée comme acquise, tandis qu'elle pourrait être l'étape cinétiquement déterminante. Pour cette raison, nous nous proposons d'étudier les deux chemins réactionnels présentés dans la Figure 24 pour la reformation du complexe de départ à partir du complexe hydrure $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H})]^+$.

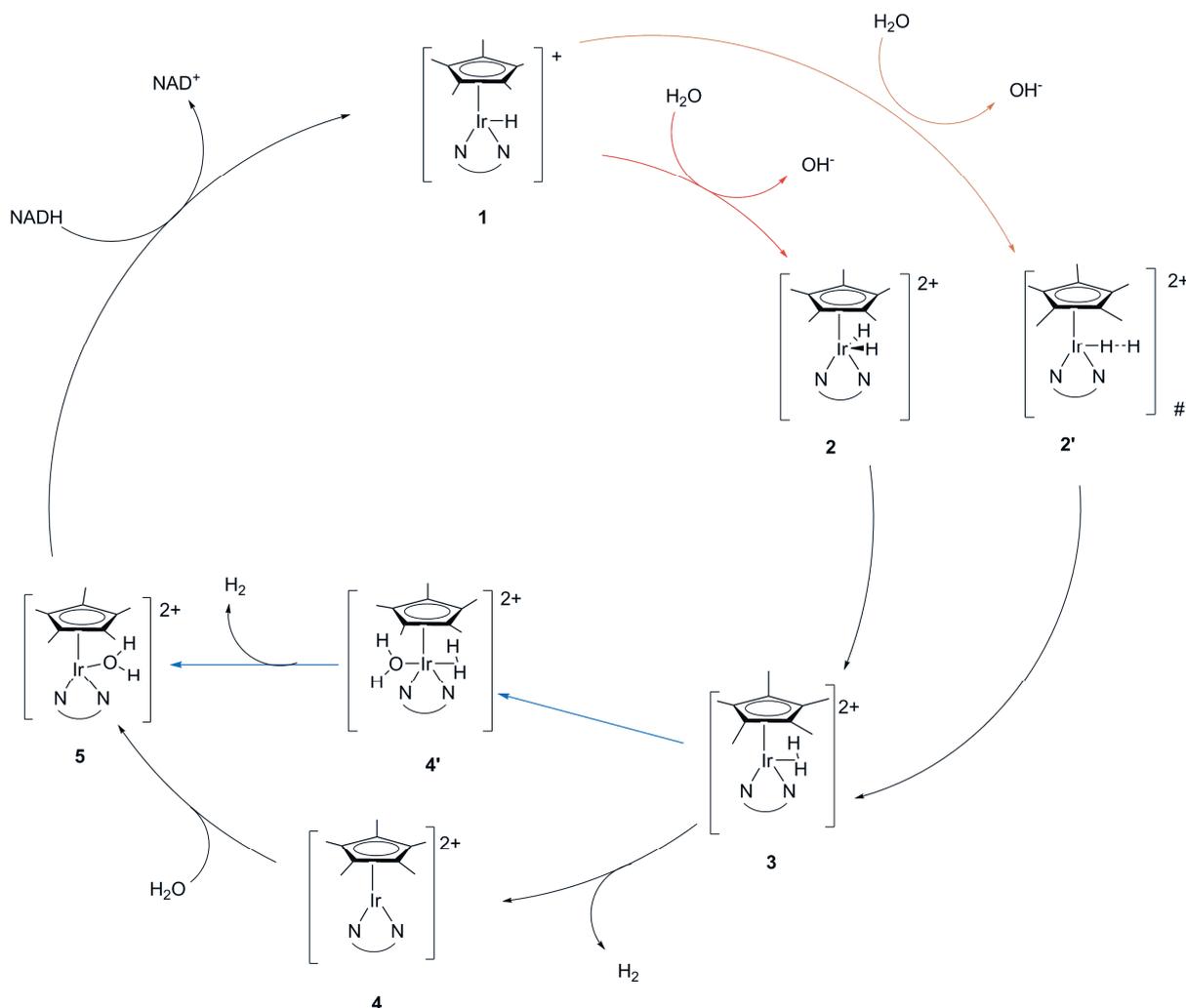


Figure 24 Proposition de mécanisme avec deux possibilités, incluant respectivement les étapes via 2 & 4, ou via 2' & 4'

Partons du postulat que le composé iridium hydruure $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H})]^+$ est formé à la suite de la régénération du cofacteur NAD^+ via l'oxydation de NADH catalysée par $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (étape 5 \rightarrow 1 sur la Figure 24). Pour régénérer l'espèce active $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ à partir de l'hydruure, Salder *et coll.* proposent simplement la formation de dihydrogène H_2 accompagnée d'une hausse de pH liée à la consommation d'un proton, sans aucun détail mécanistique supplémentaire concernant cette étape, alors qu'elle ne semble pas triviale a priori, bien que critique pour la productivité du système.

Nous proposons de notre côté deux voies d'accès pour la formation d'un complexe « Ir-HH » par protonation du complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})\text{H}]^+$. Si le site de protonation est l'iridium, le complexe dihydruure (**2**) sera formé (voie rouge en Figure 24). Si le site de protonation est l'hydruure, c'est intermédiairement le complexe « Ir-H-H » (**2'**) qui sera formé (voie orange en Figure 24). Ce complexe est un état de transition, symbolisé par le sigle # dans le schéma Figure 24.

Le complexe (**2'**) implique l'arrivée d'un proton chargé positivement vers un complexe également chargé positivement, étape a priori électrostatiquement défavorable. Pour cela, nous avons simulé la répartition des charges en utilisant le formalisme de Bader permettant d'évaluer les charges sur les atomes du complexe optimisé sans dépendre de la base. La charge calculée sur l'iridium est de +0,35 et de -0,10 sur l'hydrogène. Cela montre que le chemin orange est possible car, malgré une charge positive sur le complexe, l'hydrure reste chargé négativement et peut permettre la récupération d'un proton à partir d'une molécule d'eau.

Il faut noter que le complexe (**2**) implique un atome d'iridium au degré d'oxydation (+V), état d'oxydation moins fréquemment rencontré dans le cas de l'iridium. Un complexe d'Ir(V) avec un ligand cyclopentadiényle et portant deux hydrures est par exemple décrit dans la littérature confortant la probabilité d'existence de l'espèce pour notre proposition.¹³

La modélisation du chemin mettant en jeu la protonation de l'hydrure pour donner le complexe (**3**) via l'état de transition (**2'**) est néanmoins compliquée. En effet, l'arrivée simultanée d'une molécule d'eau H₂O pour former la liaison H-H hydrogène est très difficile à décrire avec un modèle de solvation implicite. Cette étape nécessite une étude par dynamique moléculaire quantique. C'est-à-dire qu'il est nécessaire de modéliser la molécule d'eau puis lui imposer des positions et évaluer les différences énergétiques des atomes. Par conséquent, nous n'écartons pas la possibilité de cette voie mais nous ne l'étudierons pas.

L'observation expérimentale d'un complexe sigma-H₂ d'iridium dicationique comme le complexe (**3**) a déjà été largement rapporté dans la littérature.¹⁴

Nous étudierons donc :

- l'étape de formation du complexe dihydrure (**2**) ;
- le réarrangement du complexe (**2**) en complexe (**3**) σ -H₂ ;
- l'étape de coordination d'une molécule d'eau ;
- le dégagement du dihydrogène pour reformer le complexe actif (**5**).

Les deux derniers points peuvent être interprétés sous deux versions, selon que la coordination de l'eau précède le dégagement du dihydrogène en passant par l'intermédiaire (**4'**) ou inversement par l'intermédiaire (**4**) pour dans les deux cas aboutir au complexe actif (**5**).

L'optimisation du complexe 4' n'a pas été possible. En effet, aucun minimum énergétique n'est trouvé avec les deux ligands H₂O et H₂ coordonnés sur le métal. Ainsi, nous supposons que cette espèce d'iridium au degré d'oxydation III n'est pas stable et ne correspond pas à l'intermédiaire

¹³ Esteruelas, M. A.; Ferna, F. J.; Lo, A. M.; On, E. *Organometallics* **2006**, No. 1, 5131–5138

¹⁴ Morris, R. H. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 8588-8654.

impliqué dans l'échange de ligand entre H_2O et H_2 . Nous écartons par conséquent cette version du mécanisme *via* l'intermédiaire 4' (voie bleue).

Le mécanisme simplifié étudié par DFT est donc celui présenté en Figure 25.

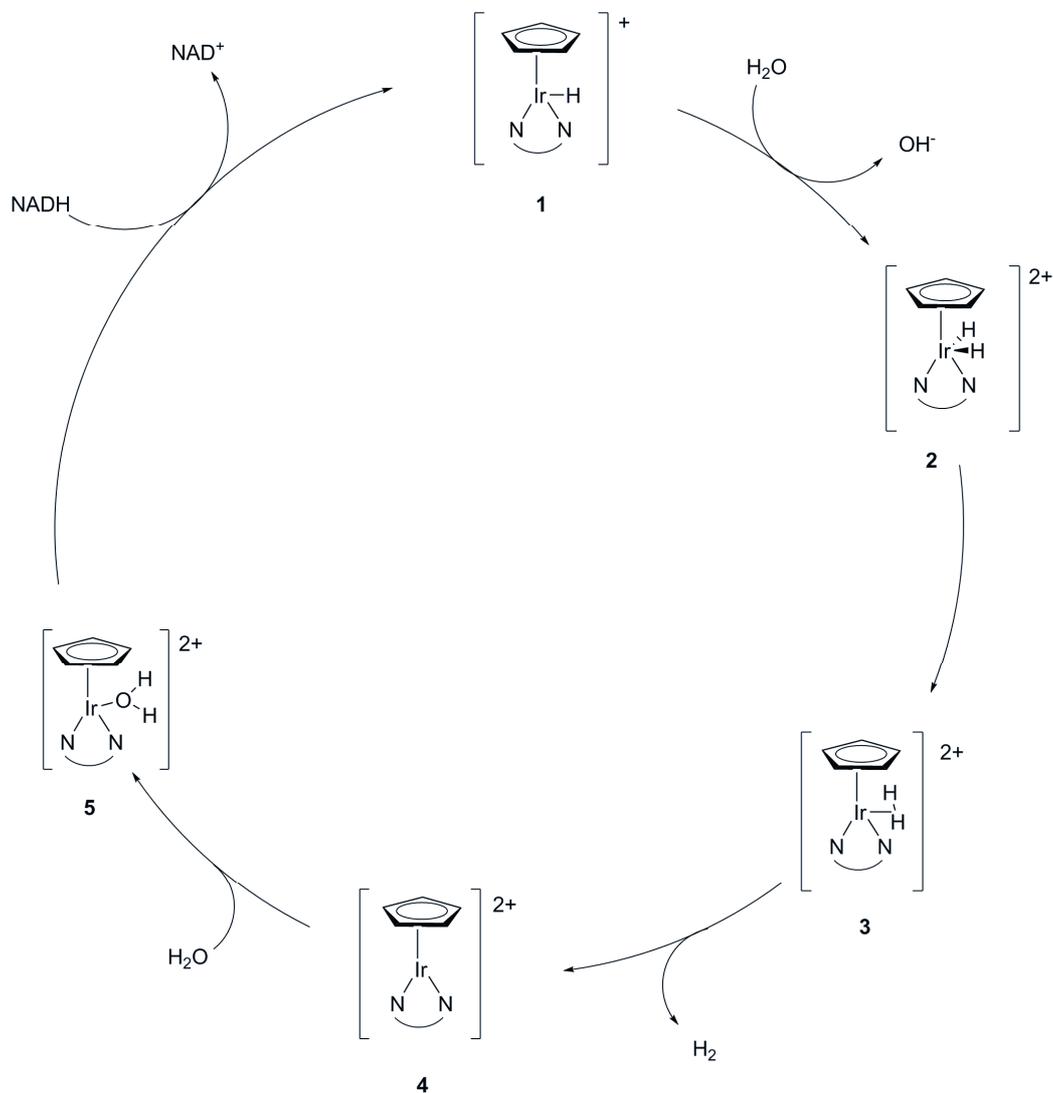


Figure 25 Mécanisme proposé par l'étude DFT

Chaque espèce a été optimisée géométriquement puis les états de transition ont été déterminés. Les caractéristiques géométriques des complexes sont données dans le Tableau 3

Tableau 3 Caractéristiques géométriques des complexes

Complexe	Distance Ir-H	Distance H-H	Angle H-Ir-H
1	1,59	-	-
2	1,58	1,57	59,5
2-3	1,60	1,23	45,1

3	1,83	0,83	26,2
3-4	2,54	0,75	28,1

La coordination du ligand aqua H_2O à partir du complexe **4** n'est pas calculée car il s'agit de la coordination d'une molécule de solvant. Le complexe étant entouré de molécules d'eau, la coordination de celle-ci se limite à la rupture de deux liaisons hydrogènes $\text{H}-\text{OH}_2-\text{H}$ pour coordiner l'atome d'oxygène sur l'iridium. La modélisation de cette étape dans un modèle de solvation apporte des incertitudes tandis que le système est simple. L'énergie d'activation de cette étape est estimée à $11,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

L'étape de protonation de l'iridium du complexe **(1)** pour former le complexe dihydrure **(2)** n'est pas non plus modélisée. Nous sommes parvenus à décrire les deux minimums correspondant aux complexes **(1)** et **(2)**, mais nous rencontrons un problème de description pour obtenir l'état de transition **(2')**. On sait qu'un état de transition existe car on sait décrire les deux minimums. De plus, cette étape de calcul de la protonation de l'atome d'iridium ne peut pas prendre en compte le pH de la solution, qui est pourtant un facteur clé de la réactivité.

A partir de toutes ces géométries optimisées, on peut obtenir le chemin réactionnel décrit en Figure 26.

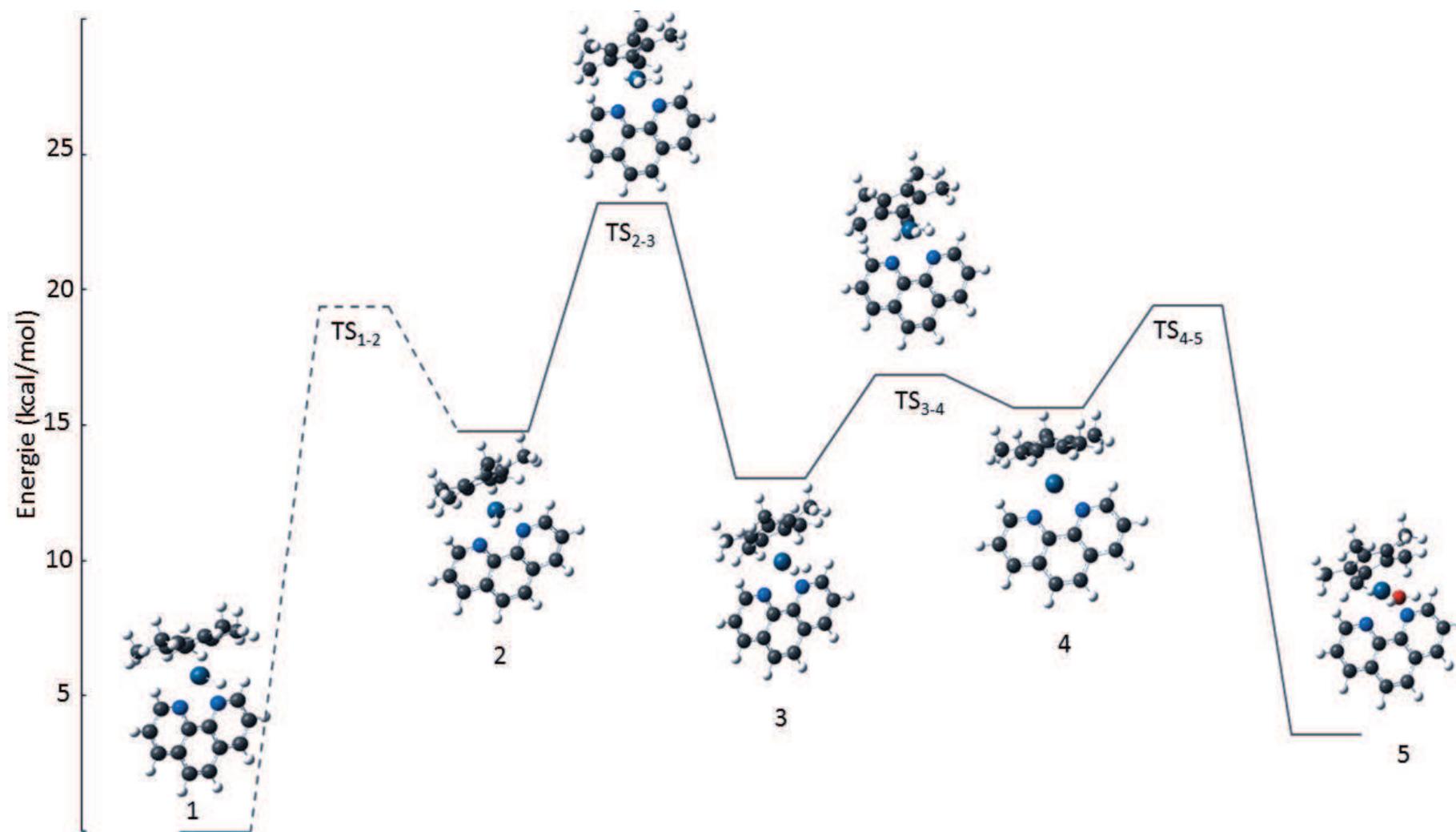


Figure 26 Chemin réactionnel obtenu par DFT

Les barrières énergétiques calculées ne dépassent pas 23 kcal.mol^{-1} . Ceci montre que, dans nos conditions de réactions, ces barrières sont tout à fait franchissables. Par conséquent, si l'on revient aux propositions de mécanisme de la Figure 24, on peut conclure que la voie rouge que nous avons modélisée et schématisée en Figure 25 est une voie probable.

L'étude théorique (DFT) nous a permis de proposer un mécanisme de reformation de l'espèce active du complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ à partir du complexe hydrure $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H})]^+$ avec de faibles barrières énergétiques compatibles avec nos conditions opératoires. Le mécanisme proposé met en jeu la protonation du complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})\text{H}]^+$ pour former ensuite du dihydrogène et reformer dans l'eau le complexe actif $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$.

Conclusion

Après la synthèse et la caractérisation du complexe d'iridium choisi, ce dernier a été utilisé pour effectuer la régénération du cofacteur NAD^+ en quantité stœchiométrique puis catalytique. Ainsi, il a pu être mis en évidence que le complexe synthétisé possède la capacité de régénérer catalytiquement le cofacteur avec un TON de $2,4 \pm 0,4$ à 150 minutes.

L'étude du mécanisme nous a permis de constater qu'un pH acide favorise la réaction et un dégagement de dihydrogène a lieu. Par conséquent, le pH de la solution semble être un facteur important. Dans le cas d'un pH neutre ou basique, l'étape cinétiquement déterminante serait la régénération de l'espèce active à partir de l'espèce hydrure, tandis qu'à un pH acide l'étape limitante serait la formation de l'adduit iridium-NADH.

Les faibles valeurs obtenues et le peu d'informations disponibles dans la littérature nous ont ensuite poussé à réaliser l'étude du mécanisme théoriquement avec la DFT. Cette méthode nous a permis de proposer le mécanisme en Figure 27 pour la régénération catalytique du NAD^+ .

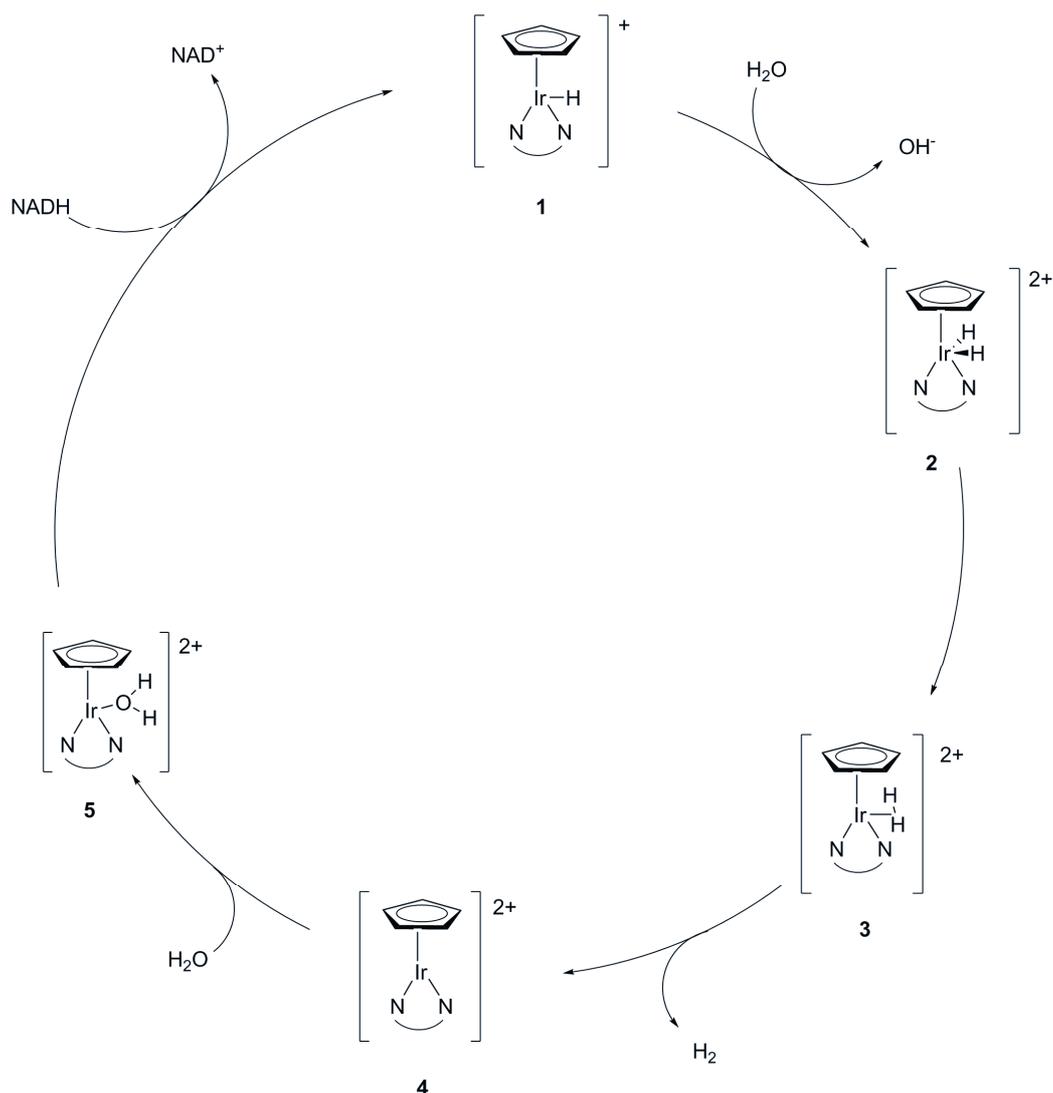


Figure 27 Mécanisme proposé pour la régénération de NAD⁺ avec le complexe Cp*Irphen

Dans le chapitre précédent, nous avons établi que les enzymes alcool déshydrogénase choisies sont actives dans des zones de pH légèrement basiques. Pour espérer mettre en œuvre un système hybride efficace, il est préférable d'opérer dans des conditions de pH optimales pour les deux catalyses. A partir de ce constat, nous avons estimé, sans grande difficulté, qu'il était beaucoup moins fastidieux de modifier la nature électronique du ligand phénantroline de l'iridium pour tenter d'accélérer les réactions en milieu moins acide plutôt que de faire une étude d'ingénierie génétique sur l'enzyme déshydrogénase pour la rendre acidophile. L'impact de l'environnement électronique autour de l'iridium sera donc étudié expérimentalement et théoriquement en prenant en compte toute la méthodologie développée dans le présent chapitre. Un intérêt tout particulier sera apporté à l'étape de formation du complexe dihydruure à partir du complexe hydruure et d'un proton du milieu.

L'équipe de P. Haquette ayant mis en évidence un effet important du ligand [N,N] pour les complexes de rhodium et de ruthénium pour la réaction de régénération inverse à la nôtre (*c.-à-d.*, NAD⁺ + H⁻ →

NADH), nous nous proposons d'étudier cette influence dans le cas de notre complexe dans le prochain chapitre dans l'objectif de mieux adapter l'activité du complexe à des valeurs de pH au plus proche du pH optimal de l'enzyme.

Partie expérimentale

Synthèse du complexe

On introduit 40 mg (0,06 mmol) de $[\text{IrCp}^*\text{Cl}_2]_2$ et 24 mg (0,12 mmol) de phénantroline dans 5 mL de méthanol à reflux sous agitation pendant 10 h sous atmosphère inerte. On ajoute 45 mL d'eau distillée et 1,98 équivalents de AgNO_3 sous agitation pendant 3 h à température ambiante. On filtre la solution puis le solvant est évaporé. On sèche le composé pendant 12 h. On effectue une recristallisation dans méthanol/diéthyléther. Les cristaux sont filtrés, lavé au diéthyléther, broyés puis séchés. Rendement : 46 mg (60%); RMN ^1H (D_2O) = 1,5 (15H, s), 8,3 (2H, dd), 8,4 (2H, s), 9,0 (2H, d), 9,6 (2H, d). RMN ^{13}C (D_2O) voir Figure 6 (c.f. nomenclature dans la partie Abréviations et ci-après).

Caractérisations

RMN

Les spectres RMN sont enregistrés à température ambiante sur des spectromètres Brüker Advance 300 MHz et Brüker Advance 400 MHz équipé d'une crysonde. Les déplacements chimiques δ_{iso} pour le ^1H et le ^{13}C sont rapportés en ppm, par rapport à Me_4Si comme standard externe. Les constantes de couplage J sont données en hertz. Les abréviations suivantes ont été employées pour décrire les signaux : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet). Toutes les données ont été traitées avec le logiciel Topspin 3.2.

Les méthodes d'acquisition des spectres utilisées sont celle par défaut présente dans le logiciel TopSpin :

- RMN ^1H : zg ;
- RMN 2D : NOESY ;
- RMN ^{13}C : APT ;
- RMN ^1H suppression pic du solvant : WET.

DRX

Les monocristaux sont étudiés par diffraction des rayons (DRX) en utilisant un diffractomètre Gemini kappa geometry (Agilent Technologies UK Ltd) équipé d'un détecteur Atlas CCD et utilisant la radiation K_α du cuivre ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$)

Les données sont collectées à 150 K à l'aide du logiciel CrysAlis Pro. Les index de réflexions, paramètres de mailles ont été acquises avec ce même logiciel. Une correction d'absorption

analytique a été appliquée en utilisant les faces du cristal.¹⁵ Les constants hkl en résultant ont été utilisées pour la résolution des structures. Les structures sont établies en utilisant la méthode SIR97¹⁶ avec la valeur de F2 la plus faible sur le logiciel CRYSTALS.¹⁷ Tous les atomes ont été définis anisotropiquement.

Régénération du cofacteur – RMN

La régénération du cofacteur est observée par RMN sur le spectromètre Brüker Advance 400 MHz équipé d'une sonde TBI. Avant chaque étude de régénération, la température de la sonde est réglée à 37 °C avec calibration à l'aide d'un tube scellé de 80% de glycol dans du diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO d6).

Chaque réaction est effectuée dans un tube RMN de 5 mm avec un insert coaxial de 2 mm. On insère dans le coaxial une solution d'acétate de strontium (CH₃COO)₂Sr à 0,7 mM. Le temps de relaxation T1 est fixé pour toutes les acquisitions à 40 s afin d'assurer des mesures quantitatives.

DFT

Les calculs *ab initio* ont été réalisés à l'aide du logiciel Gaussian 03¹⁸ selon la méthode hybride B3LYP.¹⁹ Les optimisations géométriques du complexe ont été calculées en phase gaz. L'iridium est modélisé avec le pseudopotentiel SDD, les autres atomes étant modélisés avec la base 6-31G**(d,p).²⁰ La nature des points stationnaires est confirmée par une analyse en mode normal.

Le logiciel Gaussview 05²¹ a été utilisé pour générer des figures à partir des résultats obtenus.

¹⁵ Clark, R. C.; Reid, J. S. *Acta Cryst* **1995**, A51, 887–897

¹⁶ Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Grazia, A.; Moliterni, G.; Polidori, G.; Spagna, R. *J. App. Cryst.* **1999**, 32, 115–119.

¹⁷ Betteridge, P. W.; Carruthers, J. R.; Cooper, R. I.; Prout, K.; Watkin, D. J. *J. App. Cryst.* **2003**, 36, 1487.

¹⁸ M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Pet, and J. A. P. 2004.

¹⁹ Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648–5652.

²⁰ Peterson, G. A.; Al-Laham, M. A. *J. Chem. Phys.* **1991**, 94, 6081–6090

Chapitre 4 Impact du ligand phénantroline : étude expérimentale et théorique

Introduction : choix des ligands

Dans le chapitre précédent, nous avons proposé un mécanisme de régénération du NAD^+ avec le complexe $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})$ de façon expérimentale et théorique. La protonation de l'hydrure d'iridium semble être l'étape limitante pour la régénération du NAD^+ .

Des variations de ligands ont été étudiées dans la littérature pour des réactions de transfert d'hydrure similaires à notre cas.¹ L'équipe de Goldberg a travaillé sur l'hydrogénation d'acides carboxyliques par des complexes organométalliques à base de rhodium et d'iridium, parmi eux le complexe $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})$ présenté dans le chapitre précédent. Le mécanisme mis en jeu pour l'hydrogénation d'acides carboxyliques fait intervenir un complexe sigma de dihydrogène sur l'iridium dicationique, ainsi que la formation d'un hydrure d'iridium monocationique comme décrit dans la Figure 1.

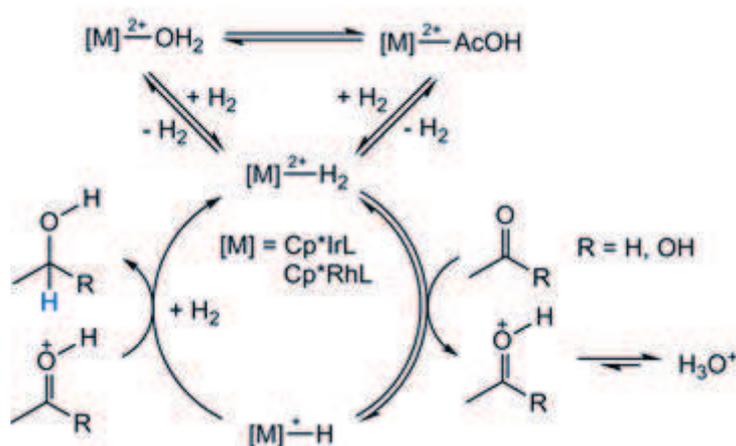


Figure 1 Mécanisme d'hydrogénation d'acide carboxylique proposé par Goldberg *et coll.* faisant intervenir un métal-hydrure et un dihydrogène coordonné sur le métal

¹ Brewster, T. P., Miller, A. J. M., Heinekey, D. M. & Goldberg, K. I., *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 16022–16025 (2013).

Dans leur étude, l'étude mécanistique a montré qu'à partir d'une certaine pression de dihydrogène, l'étape cinétiquement déterminante est le transfert d'hydrure du complexe $[\text{Ir-H}]^+$ vers le carbonyle activé. Afin d'augmenter le caractère hydrure de l'hydrogène porté par l'iridium, les auteurs ont fonctionnalisés le ligand pour le cas où L = bipyridine (*vide infra*). Ils ont ensuite évalué l'effet de ces substitutions sur l'activité du complexe. Le TON du complexe est utilisé comme critère de comparaison. Comme attendu par les auteurs, l'ajout de groupements électrodonneurs a permis une nette augmentation du TON (48%) en substituant la bipyridine avec deux groupements méthoxy. Inversement, la fonctionnalisation avec des groupements électroattracteurs diminue fortement les valeurs du TON. Ainsi, l'ajout de groupements fonctionnels sur la bipyridine a permis une importante modulation d'activité des complexes, cette dernière étant augmentée par l'enrichissement de la densité électronique sur le métal.

Dans notre cas, nous avons proposé un mécanisme pour la formation de NAD^+ à partir de NADH avec le complexe $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})$ dans le chapitre précédent. Nous avons montré que la protonation de l'hydrure d'iridium était l'étape cinétiquement déterminante pour la régénération du cofacteur NAD^+ (Étape **1** vers **2** dans la Figure 2).

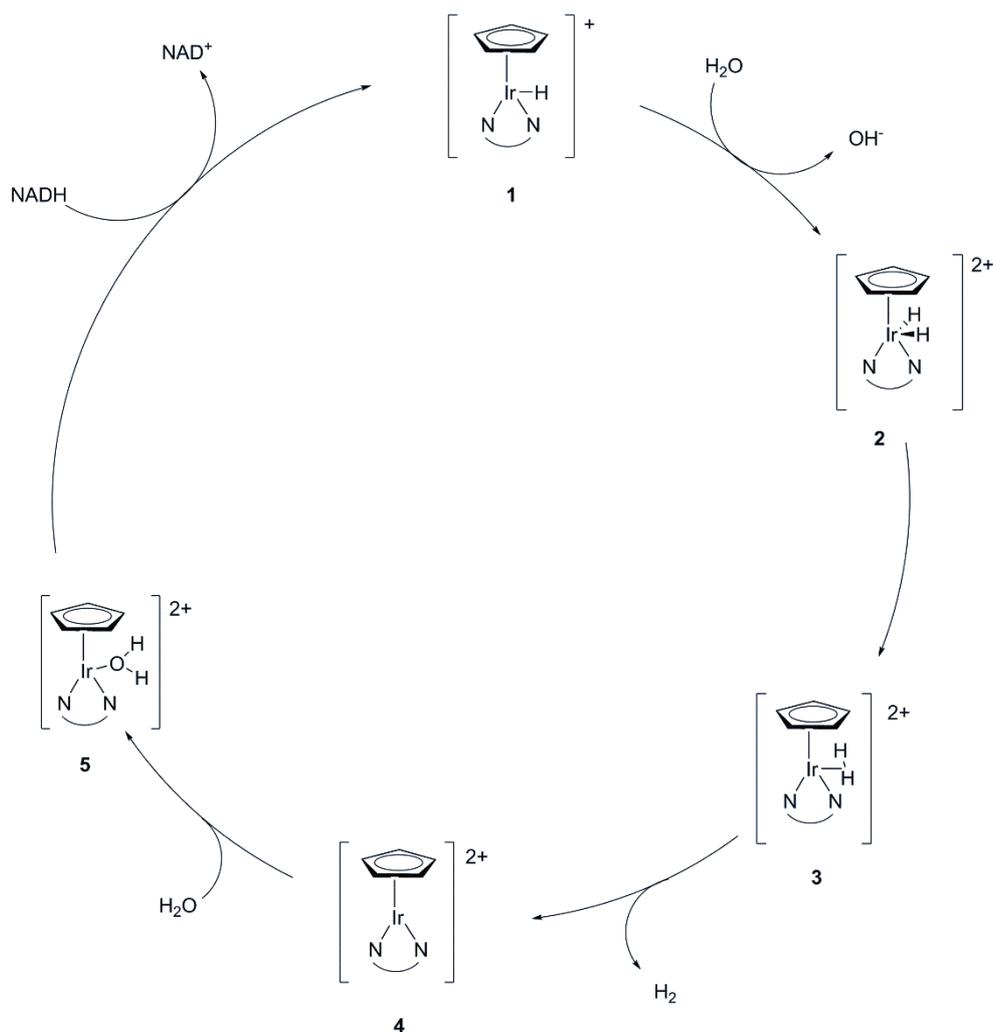


Figure 2 Mécanisme proposé pour la régénération du NAD⁺ avec le complexe Cp*Ir(phen)

En d'autres termes, pour reformer efficacement l'espèce active Cp*Ir(phen)(H₂O) **5** à partir de l'espèce hydruire **1**, l'étape de protonation du complexe Ir-H doit être facilitée : **1** → **2**. Si on fait le parallèle avec les travaux de Goldberg *et coll.*, qui dans son cas travaille sous pression d'hydrogène, notre étape cinétiquement déterminante correspond à la partie de son mécanisme décrite dans la Figure 3. Celle-ci traduit l'équilibre entre le complexe [Ir-H₂]²⁺ et l'hydruire [Ir-H]⁺ par transfert avec le carbonyle activé par l'acide, sans intervention de dihydrogène (Figure 3).

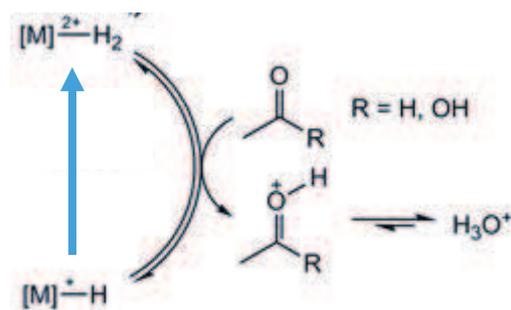


Figure 3 Partie du mécanisme de Goldberg et coll. faisant intervenir le complexe métal-hydruure et le complexe sigma métal-dihydrogène

Dans notre cas, nous nous intéressons à la formation du complexe sigma dihydrogène Ir-H₂ (**3**) à partir du complexe hydruure (**1**) (Flèche bleue en Figure 3) *via* le complexe dihydruure (**2**). L'appauvrissement de la densité électronique sur l'iridium pourrait donc très certainement faciliter la protonation du complexe hydruure en complexe dihydruure et la formation du complexe sigma dihydrogène. Par conséquent, il semble pertinent de substituer le ligand phénantroline avec des groupements plutôt électroattracteurs. Dans ce chapitre, nous présentons donc la substitution du ligand phénantroline par divers groupements électro-donneurs ou -attracteurs et l'impact de ce changement sur les performances de la réaction d'intérêt : la formation de NAD⁺ à partir de NADH. Les résultats expérimentaux seront confrontés aux résultats de modélisations issus de l'étude DFT.

I Synthèses et caractérisations

1 Synthèses

Pour étudier l'influence de différentes substitutions sur la phénantroline pour la régénération du NAD^+ par oxydation de NADH , plusieurs complexes d'iridium ont été synthétisés puis caractérisés avant d'en mesurer la réactivité. Ces ligands sont présentés Figure 4. Tous les ligands sont commerciaux et ont été utilisés sans purifications supplémentaires. La méthode de synthèse des complexes d'iridium correspondant est la même que pour la 1,10-phénantroline décrite dans la partie expérimentale du Chapitre 3 (précurseur d'iridium $[\text{Cp}^*\text{IrCl}_2]_2$).

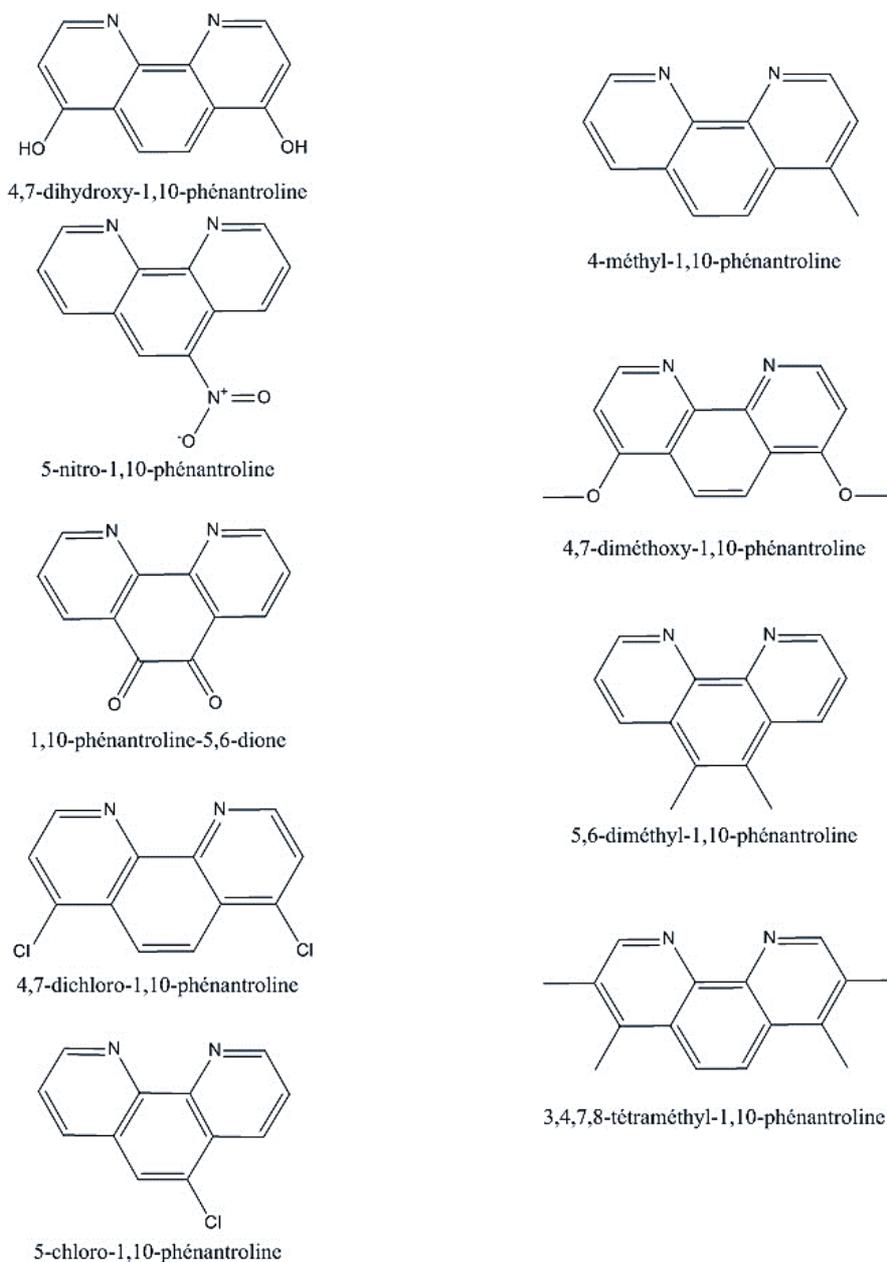


Figure 4 Variations de substituants sur le ligand phénantroline

Les rendements des synthèses des complexes ainsi que leurs solubilités respectives dans l'eau sont donnés dans le Tableau 1. La solubilité des complexes dans l'eau a été déterminée de manière suivante : environ 0,5 mg de complexe sont mis en solution dans 400 µl d'eau. La solubilisation rapide du complexe est traduite par « bonne » dans le tableau. Pour solubiliser les complexes moins solubles, les solutions ont dû être chauffées à 40 °C : la solubilité des complexes est alors mentionnée comme « moyenne » dans le tableau. Si les complexes ne sont pas solubles après chauffage et agitation vigoureuse, alors leur solubilité est indiquée comme mauvaise dans le tableau.

Tableau 1 Rendements et solubilités dans l'eau des différents complexes synthétisés

Ligand	Rendement	Solubilité dans l'eau
1,10-phénantroline	59%	Bonne
4,7-dihydroxy-1,10-phénanthroline	x	x
5-nitro-1,10-phénanthroline	43%	Bonne
1,10-phénanthroline-5,6-dione	15%	Mauvaise
4,7-dichloro-1,10-phénanthroline	54%	Bonne
5-chloro-1,10-phénanthroline	40%	Bonne
4-méthyl-1,10-phénanthroline	66%	Bonne
4,7-diméthoxy-1,10-phénanthroline	28%	Moyenne
5,6-diméthyl-1,10-phénanthroline	59%	Moyenne
3,4,7,8-tétraméthyl-1,10-phénanthroline	76%	Moyenne

La synthèse du complexe avec le ligand 4,7-dihydroxy-1,10-phénanthroline n'a pas abouti à un produit pur exploitable. La caractérisation RMN ^1H du produit obtenu après synthèse et recristallisation montre de nombreux pics correspondant à une multitude de composés difficilement séparables. Par conséquent le rendement de la synthèse n'a pas pu être calculé et sa solubilité n'a donc *de facto* pas été estimée. Ceci peut être expliqué par la présence d'impuretés dans le ligand de

départ. En effet, dans la littérature, pour les synthèses de complexe avec le ligand 4,7-dihydroxy-1,10-phénanthroline, les auteurs effectuent toujours une purification au préalable.²

Le faible rendement obtenu pour le complexe 1,10-phénanthroline-5,6-dione peut s'expliquer par les deux modes de coordination de ce ligand : soit par les atomes d'azotes, engendrant le complexe attendu Ir[N,N], soit par les atomes d'oxygènes pour un complexe de type Ir[O,O].³ Après trois recristallisations dans un mélange méthanol/diéthyléther, le complexe Ir[N,N] pur a pu être isolé et nous avons donc pu calculer le faible rendement. Cependant, ce complexe n'est pas soluble dans D₂O.

Ainsi, ces deux complexes ne seront pas testés pour la régénération du NAD⁺, et ce, pour deux raisons. D'une part, le complexe doit être pur pour pouvoir interpréter, de manière fiable, les résultats catalytiques. D'autre part, il est nécessaire de disposer d'un complexe organométallique soluble dans l'eau, milieu de prédilection des enzymes choisies dans notre étude. De par le nombre de substitutions envisagées sur la phénantroline, nous espérons néanmoins pouvoir dégager des tendances concernant l'activité de tous les complexes en fonction du caractère électro-donneur ou attracteur du substituant.

2 Caractérisations

Tous les complexes ont été caractérisés par RMN ¹H et ¹³C. Les différents spectres sont décrits dans la partie expérimentale. L'absence de signaux résiduels en RMN ¹H et les intégrations relatives nous permettent de conclure sur une pureté suffisante des complexes. Chaque complexe, exceptés les deux comportant comme ligand la 4,7-dihydroxy-1,10-phénanthroline et la 1,10-phénanthroline-5,6-dione a été obtenu avec une pureté permettant son utilisation pour les tests catalytiques.

² Y. Himeda, N. Onozawa-Komatsuzaki, H. Sugihara, H. Arakawa, K. Kasuga, *Organometallics*. **2007**, *23*, 1480-1483.

³ Murphy, D. M.; McNamara, K.; Richardson, P.; Sanchez-Romaguera, V.; Winpenny, R. E. P.; Yellowlees, L. J. *Inorg. Chim. Acta*. **2011**, *374*, 435–441.

II Impact de la variation du ligand - étude expérimentale

1. Mesure de l'activité des complexes

Chaque complexe a été utilisé à 10% molaire par rapport au NADH pour effectuer l'oxydation en NAD^+ . Comme dans le chapitre précédent, la réaction est suivie par RMN ^1H avec la même méthode de quantification des réactifs et produits. Toutefois, afin de permettre des mesures quantitatives en RMN, nous avons déterminé au préalable le temps nécessaire pour que l'aimantation longitudinale retourne à 63% de sa valeur finale. Ce temps de relaxation appelé $T1$ a été déterminé pour tous les complexes. Le $T1$ de tous les complexes s'est avéré inférieur à celui du NADH et du NAD^+ , évalués à environ une minute (55 s). En conséquence, le temps de relaxation pour les acquisitions, $D1$, pour toutes les acquisitions a été fixé à 40 secondes ($D1 > 63\% T1_{max}$).

Pour faciliter la lecture, les complexes seront référencés par la formule « $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phenX})$ » avec « X » le substituant présent sur la phénantroline. Par exemple, $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phenMe})$ est le complexe portant le ligand 4-méthyl-1,10-phénanthroline et $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen2Cl})$, le complexe portant le ligand 4,7-dichloro-1,10-phénanthroline.

La régénération de NAD^+ à partir de NADH à l'aide des différents complexes a été réalisée dans les conditions les plus similaires possibles, quelques incertitudes demeurent toutefois. D'une part, le cofacteur NADH est conservé à une température de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ et fourni avec un certain degré d'hydratation. Cependant, après différents ouvertures et prélèvements, le degré d'hydratation du cofacteur augmente, engendrant une incertitude sur le nombre de moles de NADH réellement introduites. D'autre part, les deux composés sont introduits dans le tube RMN à l'aide d'une micropipette. L'incertitude sur le volume prélevé est faible (pour $200\ \mu\text{L}$: erreur systématique = $0,48\ \mu\text{L}$; erreur aléatoire = $0,096\ \mu\text{L}$)⁴. Cependant, le D_2O étant un fluide assez visqueux ($1,25\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ pour l'eau lourde contre $0,59\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ pour le méthanol à $20\text{ }^\circ\text{C}$, par exemple) lors de l'ajout, certaines gouttes peuvent rester fixées sur les parois, engendrant ainsi quelques imprécisions dans le volume final.

La présence de la référence externe (acétate de strontium) nous permet de connaître les concentrations exactes en cofacteur et en complexe dès la première acquisition, soit environ 5 minutes après la mise en contact des deux composés. Pour les raisons évoquées dans le paragraphe ci-dessus, nous avons donc pu constater qu'au lieu d'une valeur de 10 mol.%, nous avons obtenu des solutions avec un rapport molaire entre le complexe et NADH compris entre 7,5 % et 13 %, les concentrations en complexes variant de 1,1 mM à 2,0 mM. Exceptionnellement, la

⁴ Estimé par Gilson après le contrôle annuel des micropipettes

concentration obtenue pour le complexe avec le groupement $-\text{NO}_2$ est anormalement élevée (3,4 mM). Cependant, la concentration de NADH a été ajustée pour obtenir un rapport molaire de 8,5 %.

Il faut noter que cette variation de concentrations revêt une grande importance. En effet, lors de la solubilisation du complexe dans une solution aqueuse, une variation importante du pH est observée. Par exemple, lors de l'ajout de 300 μL d'une solution du complexe $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})$ à 2 mM, soit $6 \cdot 10^{-7}$ mol dans 5 mL d'eau déionisée, le pH mesuré est de 5,3 alors qu'il est de 6,9 pour l'eau déionisée seule. Ce phénomène peut s'expliquer par la plus ou moins marquée acidité de Lewis du complexe.⁵ Or, lors de l'étude du mécanisme dans le chapitre précédent, nous avons vu que l'étape cinétiquement déterminante est la protonation du complexe pour former le dihydrogène. Plus la solution est acide, plus la réaction est ainsi favorisée (dans la limite de tolérance du cofacteur, bien entendu). Par conséquent, si la concentration en complexe est plus importante, la solution devrait être plus acide et la réaction favorisée. Il faudra donc prendre en compte ce facteur lors de l'interprétation de l'activité relative des complexes.

C'est donc avec prudence qu'on peut comparer les TON et TOF de chaque complexe. Ces derniers sont calculés, pour chaque complexe, selon les mêmes équations que celles décrites dans le chapitre précédent (Équation 1). Les TON seront calculés à partir de 90 minutes, ceci nous permettant de réaliser des tests moins longs et d'étudier un plus grand nombre de complexes.

$$TON = \frac{\text{mole de produit désiré}}{\text{mole de catalyseur}} = \frac{C_{\text{NAD}^+}}{C_{[\text{Cp}^*\text{Irphen}]^{2+}}}$$

$$TOF (\text{min}^{-1}) = \frac{TON}{\text{temps}}$$

Équation 1 Equations utilisées pour le calcul du TON et du TOF

Les valeurs calculées sont rassemblées dans le Tableau 2 avec les concentrations initiales mesurées pour chaque complexe et le rapport molaire entre le cofacteur et le complexe. On rappelle que l'incertitude sur les concentrations est évaluée à 0,05 mM, à cause de l'incertitude sur l'intégration du spectre RMN ^1H due à la présence de bruit.

Tableau 2 TON et TOF des différents complexes pour la régénération du NAD^+

Complexe		TON (90 min)	TOF (h^{-1} , pris à	Concentration de complexe	Pourcentage molaire

⁵ K. I. Fujita, R. Yamaguchi Catalytic Activity of Cp^* Iridium Complexes in Hydrogen Transfer Reactions in *Iridium complexes in organic synthesis* voir Partie 5.5 page 120 (Eds L. A Oro, C. Claver)

			10 min)	(mM)	
$[\text{Cp}^*\text{Irphen}]^{2+}$		1,8	8,7	1,4	8,0%
$[\text{Cp}^*\text{IrphenMe}]^{2+}$		0,3	4,1	2,0	9,3%
$[\text{Cp}^*\text{Irphen2Me}]^{2+}$		1,2	5,1	1,9	9,5%
$[\text{Cp}^*\text{Irphen4Me}]^{2+}$		0,7	4,2	2,0	12,9%
$[\text{Cp}^*\text{Irphen(OMe)}_2]^{2+}$		0,5	4,0	1,5	8,9%
$[\text{Cp}^*\text{IrphenCl}]^{2+}$		1,0	10,2	1,1	9,8%
$[\text{Cp}^*\text{Irphen2Cl}]^{2+}$		3,2	16,0	1,1	7,5%
$[\text{Cp}^*\text{IrphenNO}_2]^{2+}$		-	13	3,0	8,5%

Nous pouvons observer que le TOF de tous les complexes portant une phénantroline substituée par des groupements attracteurs est plus élevé qu'avec des groupements donneurs, en accord avec les prévisions émises lors de l'analyse des travaux de Goldberg *et coll.* Si le TOF de la phénantroline non substituée est de 8,7, la présence de groupements électroattracteurs (NO_2 , Cl et 2Cl) engendre des TOF supérieurs à 10, tandis que la présence de groupements électrodonneurs (xMe et 2MeO) induit des TOF autour de 5.

Nous constatons donc une tendance nette : l'activité supérieure des complexes portant des groupements électroattracteurs peut être attribuée à une diminution de la densité électronique de l'iridium. Selon le mécanisme proposé, une densité électronique plus faible sur l'iridium faciliterait effectivement la protonation du métal.

Le TON du complexe de référence (phénantroline nue) calculé à partir des données collectées après 90 minutes de réaction, est de 1,8. Les TON des complexes portant des groupements électrodonneurs lui sont tous inférieurs. Par ailleurs, pour les groupements électroattracteurs, on peut observer que le complexe portant deux atomes de chlore possède un TON nettement supérieur. Cependant le complexe dont la phénantroline porte un seul atome de chlore donne un TON inférieur à celui de la référence. Ainsi, une tendance se dessine entre les groupements électrodonneurs et électroattracteurs, toutefois, il est difficile d'analyser les résultats à partir des TON et des TOF au sein d'une même famille. De plus, nous n'avons pas été en mesure de déterminer le TON du complexe portant le groupement $-\text{NO}_2$ qui, pourtant, est le groupement le plus électroattracteur. En effet,

après 90 minutes de réaction, les signaux du NAD^+ ont été largement altérés avec l'apparition de nouveaux pics comme le montre la Figure 5 ci-après.

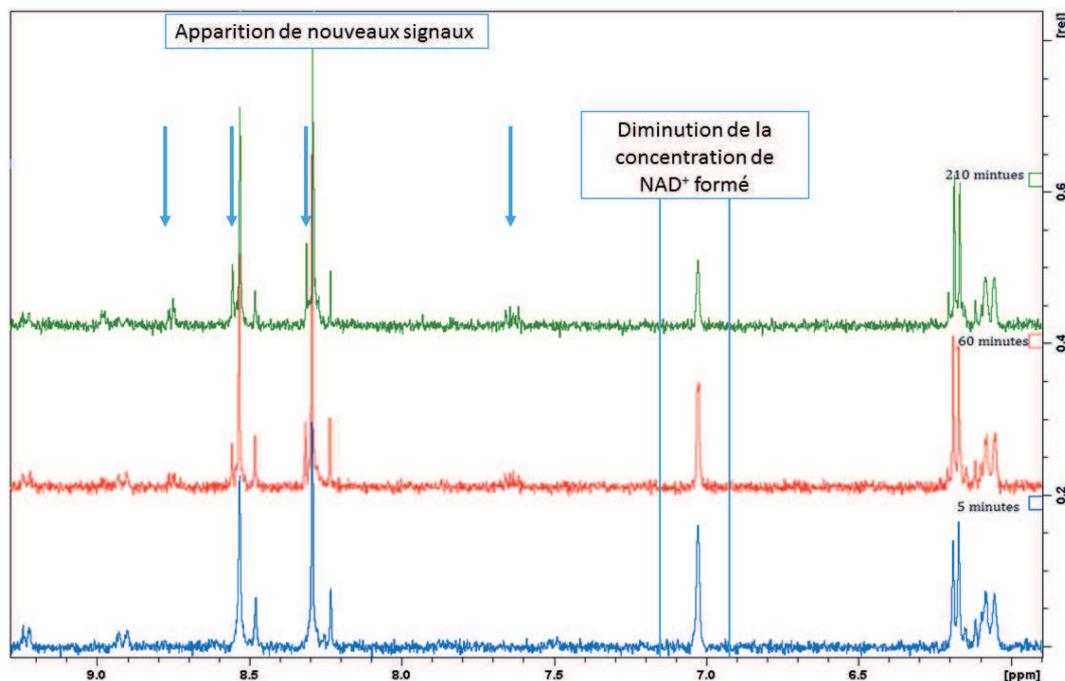


Figure 5 Evolution des spectres ^1H RMN pour la réaction entre le NADH et $\text{Cp}^*\text{IrphenNO}_2$ dans la région 6 - 9 ppm

Le cofacteur NAD^+ , initialement formé en quantité importante (8 mM soit un rendement de 20 % après 5 minutes de réaction), semble ainsi s'être décomposé au cours du temps.

Par ailleurs, lors de l'étude des réactions de formation du NAD^+ à partir de NADH avec les différents complexes, la somme de la concentration de NADH et de NAD^+ semble diminuer, par rapport à la concentration initiale en cofacteur, plus ou moins fortement selon le complexe présent dans le milieu. Ceci nous a donc amenés à étudier de plus près la sélectivité des différents complexes pour la formation du NAD^+ .

2. Etude de la sélectivité des complexes organométalliques

Des nouveaux signaux dans les spectres ont été identifiés. Leurs déplacements, leurs multiplicités ainsi que leurs intégrales varient selon le complexe utilisé et le temps. Cela suggère que, contrairement au complexe $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})$, qui a montré une sélectivité intéressante d'oxydation de NADH en NAD^+ dans le chapitre précédent, l'ajout de certains groupements fonctionnels sur la phénantroline a diminué la sélectivité.

Pour évaluer la sélectivité d'oxydation de NADH en NAD⁺ des complexes, nous avons choisi de déterminer un taux de décomposition du cofacteur lors de la réaction avec chaque complexe. Ce taux est calculé d'après l'Équation 2. L'intégration des signaux RMN du NADH, du NAD⁺ et du complexe obtenus lors de la première acquisition nous permet de connaître les concentrations initiales de cofacteur et de complexe. Notons que pour la concentration initiale de cofacteur nous additionnons les concentrations du cofacteur sous ses deux formes, oxydée et réduite, calculées pour la première acquisition si la réaction est déjà mise en place. Par la suite, à chaque acquisition, la concentration en cofacteurs dans le milieu est déterminée de la même façon, en additionnant les concentrations des deux formes du cofacteur. La différence entre la concentration en cofacteur initiale et en cofacteur à un instant t nous renseigne sur la quantité de cofacteur ayant subi des réactions secondaires de décomposition. Comme vu précédemment, la concentration en complexe étant différente à chaque réaction, le rapport entre la concentration de cofacteur ayant subi une décomposition et la concentration de complexe permet de s'affranchir de ce paramètre pour permettre une comparaison plus fiable entre chaque complexe. Ceci permet ainsi de visualiser l'influence du ligand sur la sélectivité d'oxydation de NADH en NAD⁺ par le complexe sur la Figure 6.

$$\text{taux de décomposition} = \frac{(\text{moles de cofacteur})_i - (\text{moles de cofacteur})_t}{(\text{moles de complexe})_i}$$

Équation 2 Méthode de calcul du taux de décomposition des complexes

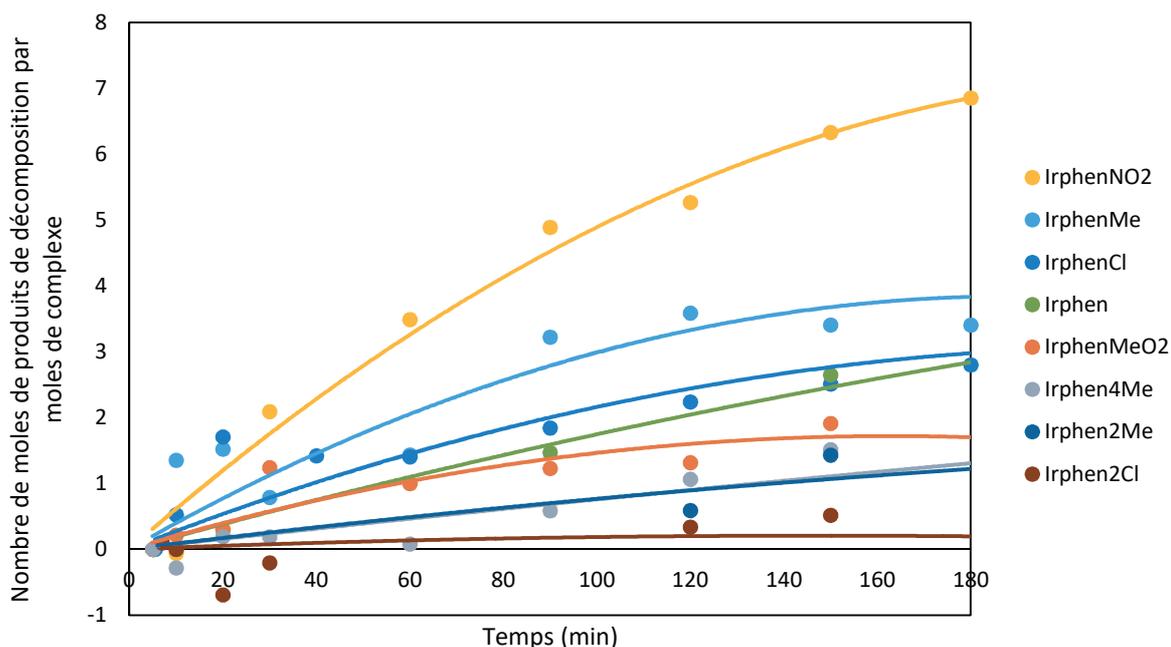


Figure 6 Sélectivité des différents complexes lors de la réaction avec le NADH (≈ 10 mol%)

On peut observer à l'aide de ce graphique un impact important de la présence de certains groupements fonctionnels portés par le ligand phénantroline sur la décomposition du cofacteur, et donc sur la sélectivité de transformation de NADH en NAD⁺ catalysée par le complexe.

Des tendances se dessinent, les valeurs absolues des points obtenus jusque-là restent approximatives à cause du manque de précision de la mesure des intégrations par RMN ¹H.

On peut voir que le complexe Cp*Ir(phenNO₂) entraîne un taux de décomposition important du cofacteur, en accord avec l'impossibilité dans le paragraphe précédent de calculer le TON de la réaction catalysée par ce complexe.

Dans notre démarche de développer un procédé de catalyse hybride éco-efficace pour la régénération *in-situ* de cofacteur de type nicotinamide, la dégradation de ces derniers lors de la régénération organométallique est bien entendue à proscrire : trouver le meilleur compromis entre activité et sélectivité est comme dans toute catalyse un critère majeur pour le choix du système catalytique.

Pour pouvoir faire ressortir des tendances plus nettes entre activité et sélectivité pour la série de complexes concernée, nous avons donc reporté en Figure 7 le taux de décomposition du cofacteur, traduisant l'aspect sélectivité, en fonction du TOF du complexe, traduisant l'activité. Les complexes idéaux présentant le compromis le plus intéressant entre activité et sélectivité se trouveront, par conséquent, en bas à droite du graphique. Nous avons choisi de considérer le taux de décomposition après 150 minutes de réaction afin d'exacerber la tendance mise en évidence dans le graphique précédent.

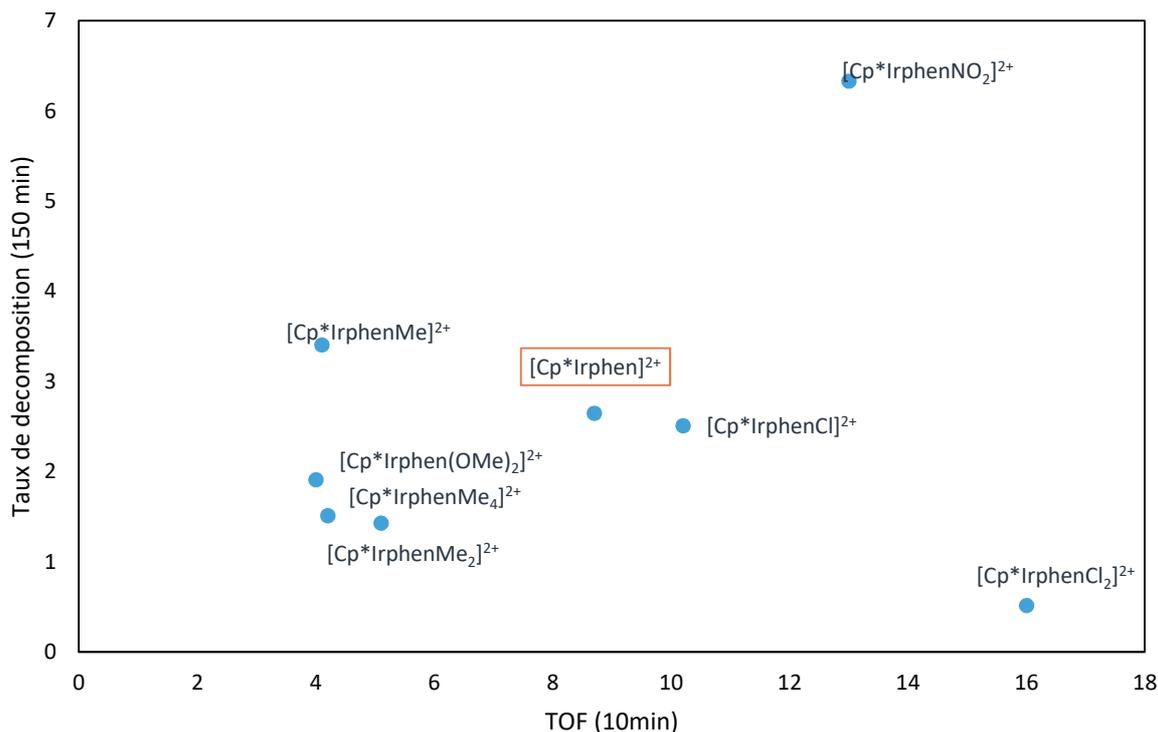


Figure 7 Taux de décomposition à 10 min des cofacteurs par mole de complexe en fonction du TOF

De manière surprenante, la première observation que nous faisons à la vue de ce graphique est l'absence de linéarité entre l'activité et le taux de décomposition. Il est fréquent d'observer en catalyse une baisse de la sélectivité d'une transformation avec l'augmentation de l'activité du catalyseur. Ici, les complexes parmi les moins actifs ne présentent pas les taux de décomposition les plus faibles, comme ceux dont le ligand phénantroline est substitué par des groupements donneurs. Le $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phenMe})$ notamment induit un des taux de décomposition les plus élevés d'environ 3, malgré un des TOF les plus faibles d'environ 4. Il n'y a, de plus, pas de relation pour cette famille entre le nombre de groupements donneurs méthyles sur la phénantroline et l'activité ou la sélectivité. Pas plus qu'il n'y a de tendances pour les groupements électroattracteurs : le ligand dichloro-phénantroline présente une activité 50% plus importante que le ligand monochloro-phénantroline, en accord avec le caractère électroattracteur des ligands mais présente néanmoins le taux de décomposition le plus faible de toute la série.

Il est donc difficile de tirer des relations structure-activité claires avec la série de ligands commerciaux envisagés dans ce premier screening et l'analyse de leur TON et TOF. Pour aider à la rationalisation de ces résultats et à la potentielle optimisation structurale des complexes organométalliques, nous avons souhaité approfondir l'étude théorique en y incorporant l'ensemble des ligands de cette série, en nous appuyant pour cela sur toute l'expérience de calculs acquises lors de l'étude du mécanisme par DFT avec le complexe de référence.

III Impact de la variation du ligand - étude théorique

Dans le chapitre précédent, nous avons proposé deux mécanismes pour former la liaison sigma entre le dihydrogène et l'iridium à partir de l'hydrure d'iridium. Soit le complexe **3** de la Figure 8 est généré à partir de la forme dihydrure du complexe (complexe **2** - voie rouge de la Figure 8), soit un hydrogène peut réagir avec l'hydrure pour former le dihydrogène (complexe **2'** - voie orange de la Figure 8). Il n'a pas été possible de décrire cette seconde possibilité à l'aide de la méthode DFT choisie. La formation du complexe dihydrure d'iridium (**2**) est le chemin réactionnel que nous avons donc étudié en DFT.

Par ailleurs, comme expliqué dans le chapitre précédent, la méthode de calcul DFT simplifiée ne nous permet pas de décrire l'étape de protonation. C'est-à-dire que l'état de transition entre les complexes **1** et **2** ne peut être obtenu et nous ne connaissons pas la valeur de la barrière énergétique à franchir pour former **2**. Il n'est donc pas possible de comparer le niveau d'énergie de l'état de transition du complexe entre **1** et **2** pour les différents groupements. Nous pouvons simplement calculer les niveaux d'énergies des complexes **1** et **2** avec les différents ligands mais cela ne nous renseigne pas sur la barrière énergétique à franchir pour former l'état de transition et accéder à la forme **2**.

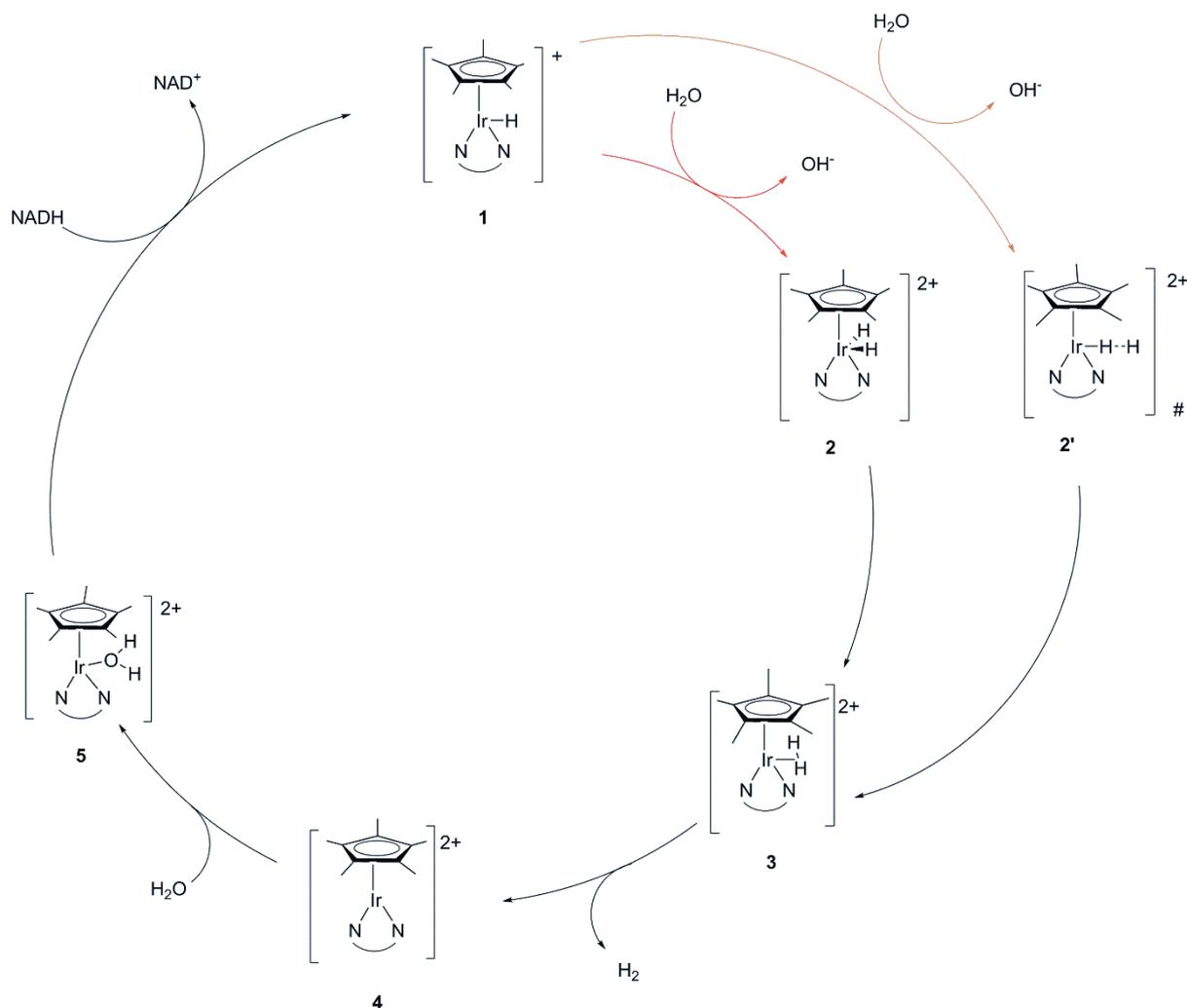


Figure 8 Proposition de mécanisme avec deux possibilités

Par conséquent, nous avons cherché des alternatives nous permettant d'avoir des informations sur l'impact des groupements de la phénantroline sur la réactivité du complexe. L'ajout de groupements modifiant la phénantroline a pour but de modifier la densité électronique sur l'iridium afin d'impacter le caractère de l'hydrure. Si l'hydrure possède une charge d'avantage négative, il est plus électronégatif et il pourra ainsi plus facilement attirer le proton et donc faciliter la formation de l'état de transition 2' Ir—H-H (voie orange). Dans le cas où la voie rouge possède une barrière énergétique plus faible que celle de la voie orange, une charge positive plus faible sur l'iridium le rendra plus riche en électron et pourra conséquemment attirer le proton plus facilement. Nous avons donc effectué une analyse par la méthode de Bader qui permet d'évaluer la répartition des charges sur chaque atome du complexe à partir des géométries optimisées par la DFT.

Les charges de l'hydrure et de l'iridium, obtenues à l'aide de cette méthode sont répertoriées dans les graphiques suivant, respectivement en Figures 9 et 10. Plus la charge de l'hydrure est négative

plus il sera électronégatif. *A contrario*, plus la charge de l'iridium sera positive, plus il sera électrodéficient.

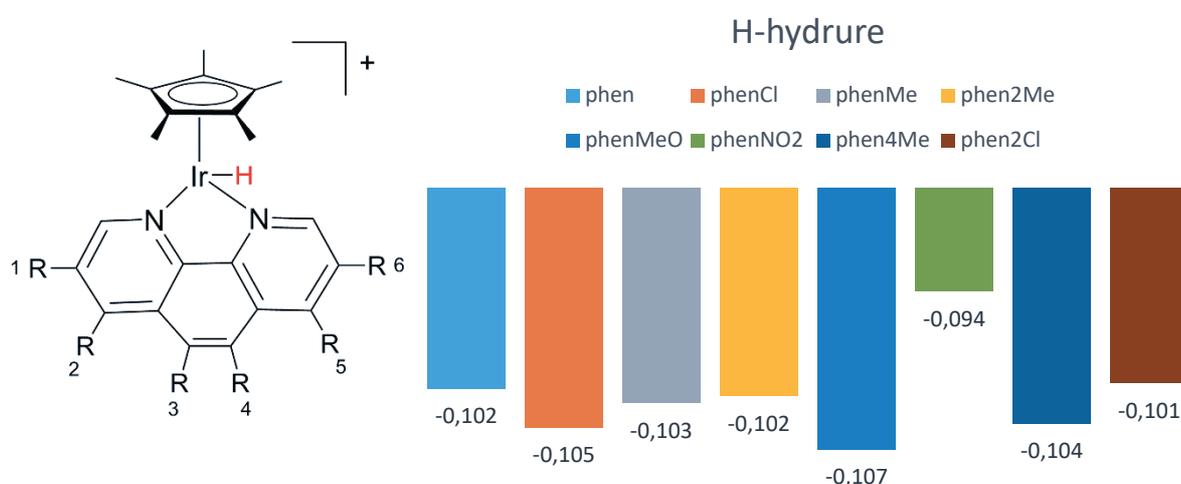


Figure 9 Impact de la substitution de la phénantroline sur la charge portée par l'hydrure

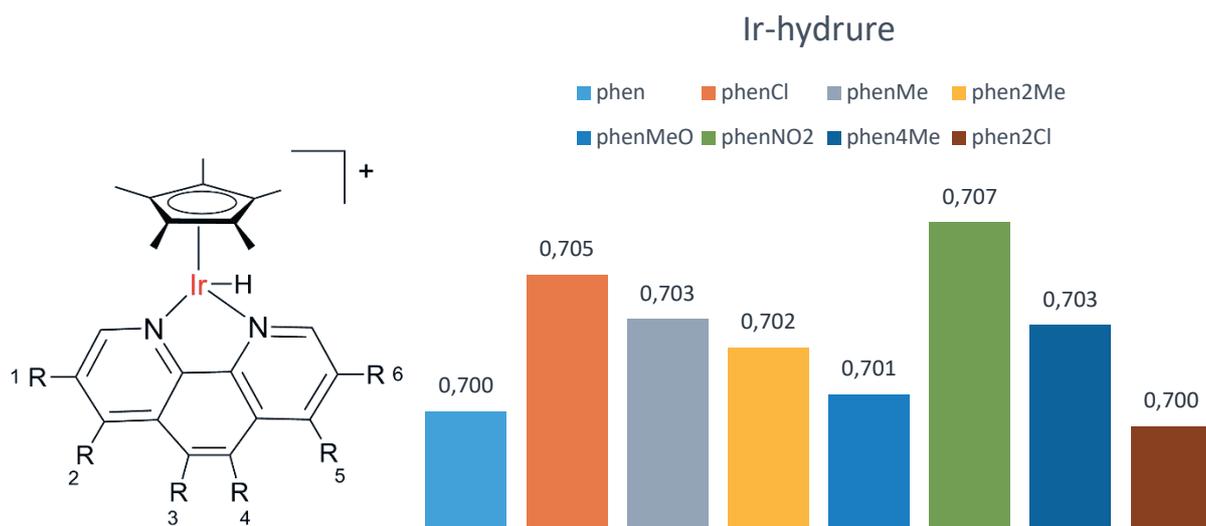


Figure 10 Impact de la substitution de la phénantroline sur la charge portée par l'iridium

Nous pouvons voir que les variations de charges en fonction du substituant portée par la phénantroline sont très faibles, que ce soit pour l'hydrure (Figure 9) ou pour l'iridium (Figure 10). Ces variations sont comprises dans l'erreur des calculs avec la base choisie (6-31**G(d,p)).

De plus, il est surprenant de voir que nous ne retrouvons pas les caractères électroattracteurs ou électrodonneurs des substituants de la phénantroline sur les charges portées par l'iridium ou l'hydrure. Par exemple, l'ajout d'un groupement donneur d'électron devrait diminuer la valeur numérique de la charge portée par l'iridium. Or, parmi les complexes avec un ligand portant un groupement attracteur, l'iridium des complexes $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phenCl})$ et $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phenNO}_2)$ porte une charge

de valeur supérieure par rapport au complexe de référence. Compte-tenu du très faible écart des charges reportées pour l'iridium et l'hydrure, de l'ordre de 1% (0,007 unités d'écart maximal pour 0,7 d'ordre de grandeur pour l'iridium par exemple) et de l'impossibilité de rationaliser les valeurs selon le caractère électrodonneur et électroattracteur, nous pouvons dire que l'ajout des groupements sur la phénantroline ces groupements auraient une faible influence sur l'environnement électronique de l'iridium.

Une autre méthode qui nous permettrait de décrire un effet des groupements sur la protonation de l'hydrure d'iridium est le calcul et la comparaison des niveaux d'énergie des orbitales atomiques dites LUMO « basses vacantes » et HOMO « hautes occupées » des complexes sous forme hydrure d'iridium. En effet, lors de la protonation, l'orbitale basse vacante va interagir avec l'orbitale d'un proton d'une molécule d'eau pour former une nouvelle combinaison d'orbitales. Une orbitale HOMO élevée rendra le complexe plus réactif. Ceci montrera une plus grande activité du complexe pour la protonation. Dans le graphique comparatif présenté en Figure 11, nous avons choisi le complexe de référence $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})$ et deux complexes caractéristiques pour l'effet inductif donneur et attracteur des groupements portés par la phénantroline, respectivement : $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen}2\text{MeO})$, et $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen}2\text{Cl})$. Les substituants sont de plus portés sur les mêmes positions de la phénantroline en (4, 7).

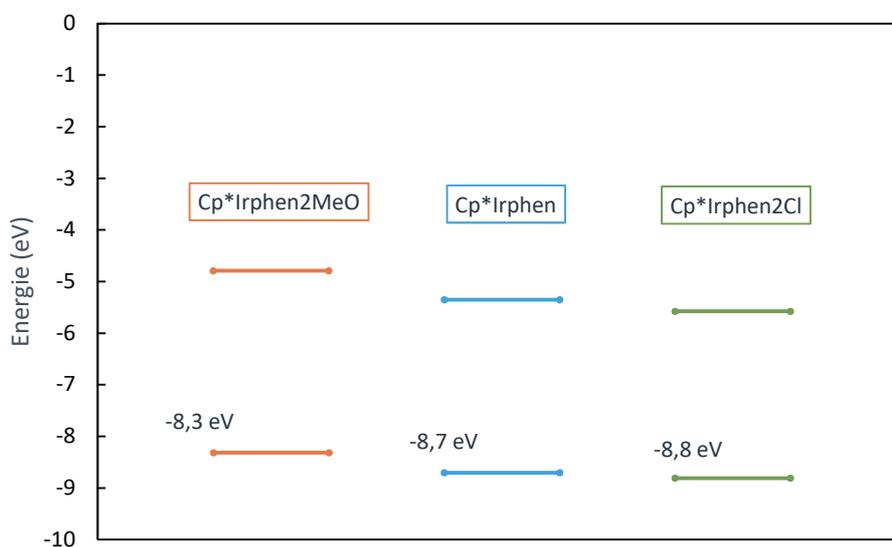


Figure 11 Niveaux d'énergie des orbitales HOMO et LUMO pour les complexes hydrures, $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{H})\text{phen}2\text{MeO}$ (orange), $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{H})\text{phen}$ (bleu) et $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{H})\text{phen}2\text{Cl}$ (vert). Les différences d'énergie entre les deux niveaux sont indiquées.

Il faut cependant bien considérer qu'il existe une incertitude sur la mesure de la valeur des énergies d'orbitales pour les complexes d'iridium, comme déjà évoqué dans ce manuscrit avec l'article de K.

Hopmann.⁶ L'incertitude sur la mesure des énergies avec la fonctionnelle B3LYP est évaluée à 5 kcal/mol = 0,22 eV. Dans la Figure 11, nous évaluons le niveau d'énergie de l'orbitale HOMO des trois complexes. Les différences sont très faibles et, de même que pour la méthode de Bader, comprises dans l'incertitude de la base choisie. Par conséquent, au niveau énergétique, l'ajout de groupement sur la phénantroline a un faible impact. Ces informations nous permettent de dire que l'activité des complexes entre eux pour la protonation sera semblable. En effet, expérimentalement, une augmentation de l'activité d'un rapport 2, dans notre gamme de température reflète d'un faible changement énergétique.

En conclusion, l'ajout de groupements attracteurs d'électrons montre théoriquement par la comparaison des charges et des valeurs des orbitales HOMO des complexes que la réaction serait peu impacté par l'ajout de groupement sur la phénantroline. Cette observation a également été faite par l'équipe de Canivet.⁷ Ces derniers, observe une variation d'activité de l'ordre de 1,4 lors de l'ajout de groupement nitro sur la phénantroline coordiné à un atome de rhodium. Par conséquent, d'autres changements sur le complexe serait a étudiée théoriquement afin d'identifier de réelles modifications énergétiques. La méthode DFT pourrait ainsi rendre prédictible une modification d'activité du complexe grâce à ces méthodes. Elle ne pourra pas cependant en l'état permettre de nous informer sur la sélectivité de la réaction. En effet, expérimentalement, nous avons remarqué que malgré une augmentation de l'activité pour le groupement nitro par exemple, fortement électroattracteur, la sélectivité était dégradée. Ainsi, une étude combinant modélisation théorique et mise en œuvre expérimentale reste préférable.

⁶ Hopmann, K. H. *Organometallics* **2016**, 35 (22), 3795–3807.

⁷ J. Canivet, G. Süß-Kink, P. Stepnicka, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 4736-4742.

Conclusion : corrélation entre la théorie et l'expérimental

L'ajout de groupements attracteurs ou donneurs a montré des effets nets sur l'activité oxydante des complexes d'iridium pour transformer le NADH en NAD⁺. En l'appliquant au système étudié dans ces travaux, nous avons également constaté une influence importante de certains groupements sur la sélectivité du catalyseur, entraînant une dégradation plus ou moins poussée des structures des cofacteurs.

Expérimentalement, l'ajout de groupements électroattracteurs a permis une augmentation de l'activité pour la formation de NAD⁺ à partir de NADH. Cependant, nous avons également observé un effet néfaste sur la sélectivité de transformation catalysée par le complexe. Le complexe Cp*Ir(phenNO₂) portant le groupe le plus attracteur, même s'il présente la plus grande activité intrinsèque, entraîne aussi une dégradation importante de la sélectivité. Le cofacteur ayant un prix élevé, une sélectivité importante est requise. Par conséquent, ce complexe a été écarté de notre étude. Le complexe Cp*Ir(phen2Cl), apparaît de son côté comme un complexe prometteur. Il montre non seulement une activité supérieure par rapport à celle du complexe Cp*Irphen, mais aussi une meilleure sélectivité. Ainsi, c'est ce complexe qui sera envisagé au système hybride.

Nous avons ensuite réalisé une étude théorique sur les différents complexes appliqués à la réaction de régénération de cofacteur. La méthode de Bader, permettant d'évaluer la répartition des charges sur les complexes, ne semble pas adaptée à notre système. Des trop grandes approximations pour le calcul des énergies des complexes et des différences de valeurs trop ténues sont à déplorer, plus particulièrement suite à l'application de pseudo-potentiels pour l'iridium. L'étude subséquente autour des orbitales des complexes sous forme hydrure nous a cependant permis de déterminer les niveaux d'énergie des orbitales HOMO et LUMO. Ce paramètre favorisant la réactivité du complexe vis-à-vis de la molécule d'eau, les résultats de cette méthode théorique nous ont également permis de montrer un faible impact des groupements électroattracteurs ou électrodonneurs sur l'environnement électronique de l'iridium. Des variations telles que la modification du métal ou du Cp* sont à envisager pour évaluer les impacts sur la protonation du complexe. Il faudra tout de même garder en tête la limitation de la méthode qui ne permet pas de modéliser des tendances en termes de sélectivité, pour lesquelles aucun paramètre prédictif ne peut être mis en évidence en l'état de l'avancement du projet.

Finalement, l'étude d'une grande série de ligands nous a permis de mettre en évidence expérimentalement un complexe ayant une activité et une sélectivité améliorées par rapport au complexe de référence. Ces résultats ont ensuite été exploités par une méthode théorique qui ne

nous ont permis de mettre en évidence le faible impact des groupements sur le complexe sous forme hydrure.

Après avoir étudié la réaction enzymatique et la réaction de régénération du cofacteur par un complexe organométallique, la mise en place d'un système hybride peut enfin être décrite. Ceci fait l'objet du chapitre final.

Partie expérimentale

Les analyses RMN et les calculs DFT ont été menées dans les conditions décrites dans le chapitre 3.

Spectres ^1H RMN des complexes :

5-nitro-1,10-phénanthroline

(D_2O , 400 MHz) δH : 1,5 (15H, s), 7,6 (1H, dd), 7,8 (1H, dd), 8,4 (1H, dd), 8,6 (1H, s), 8,9 (1H, dd), 9,1 (1H, dd).

1,10-phénanthroline-5,6-dione

(D_2O , 400 MHz) δH : 1,4 (15H, s), 7,5 (2H, dd), 8,3 (2H, dd), 9,0 (2H, dd).

4,7-dichloro-1,10-phénanthroline

(D_2O , 400 MHz) δH : 1,4 (15H, s), 7,7 (2H, d), 8,3 (2H, s), 9,0 (2H, d).

5-chloro-1,10-phénanthroline

(D_2O , 400 MHz) δH : 1,5 (15H, s), 7,6 (1H, dd), 7,7 (1H, dd), 7,8 (1H, s), 8,2 (1H, d), 8,6 (1H, d), 9,0 (1H, d), 9,1 (1H, d).

4-méthyl-1,10-phénanthroline

(D_2O , 400 MHz) δH : 1,5 (15H, s), 2,7 (3H, s), 7,4 (1H, d), 7,5 (1H, dd), 7,7 (1H, d), 8,0 (1H, d), 8,2 (1H, d), 8,9 (1H, d), 9,0 (1H, dd).

4,7-diméthoxy-1,10-phénanthroline

(D_2O , 400 MHz) δH : 1,5 (15H, s), 4,0 (6H, s), 7,0 (2H, d), 8,1 (2H, s), 9,7 (2H, d).

5,6-diméthyl-1,10-phénanthroline

(D_2O , 400 MHz) δH : 1,5 (15H, s), 2,6 (6H, s), 7,5 (2H, dd), 8,4 (2H, d), 9,0 (2H, d).

3,4,7,8-tétraméthyl-1,10-phénanthroline

(D_2O , 400 MHz) δH : 1,5 (15H, s), 2,4 (6H, s), 2,6 (6H, s), 8,0 (2H, s), 8,7 (2H, s).

Chapitre 5 Système hybride

Introduction

L'étude de la catalyse enzymatique dans le chapitre 2 nous a permis de déterminer les cinétiques réactionnelles de production de fructose par une sorbitol (SDH) ou une mannitol (MDH) déshydrogénase en fonction des conditions opératoires (pH, température) et en présence du cofacteur NAD^+ . Les enzymes ont montré des activités optimales, en solution aqueuse, à des températures proches de $37\text{ }^\circ\text{C}$ et à des pH légèrement basiques comme le résume la Figure 1.

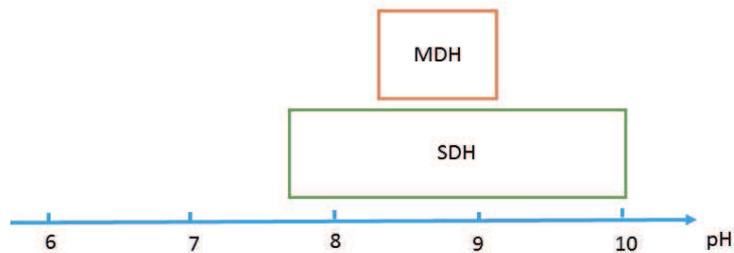


Figure 1 Rappel : fenêtres de pH optimale des Mannitol (MDH) et Sorbitol (SDH) déshydrogénases pour la transformation d'hexitols en fructose

Les chapitres 3 et 4 ont d'un autre côté montré la capacité de plusieurs complexes organométalliques à base d'iridium à oxyder le NADH en NAD^+ en solution aqueuse à $37\text{ }^\circ\text{C}$. L'étude mécanistique de cette régénération a révélé la consommation d'un proton du milieu pour retrouver la forme active du complexe, régénération accompagnée de la formation de dihydrogène libéré dans le milieu.

Ayant ainsi caractérisé les propriétés des deux réactions séparément, et ayant constaté qu'elles tolèrent des conditions opératoires communes, nous avons ensuite tenté de combiner ces deux systèmes catalytiques en un système intégré de catalyse hybride. Lors de la mise en œuvre d'une catalyse hybride de ce type, des phénomènes d'inhibition entre les catalyseurs peuvent apparaître : le complexe organométallique est potentiellement capable d'interagir avec certains acides aminés ou groupe d'acides aminés de l'enzyme, ce qui peut avoir des conséquences néfastes autant sur l'activité enzymatique que sur l'activité chimique. De plus, les pH basiques ou légèrement basiques

imposés par l'enzyme peuvent influencer la capacité des complexes organométalliques à réaliser la régénération du cofacteur de façon catalytique.

Dans ce dernier chapitre, nous allons donc étudier le système hybride incluant les deux réactions, enzymatique et chimique, en « one-pot one-step » selon le principe de la Figure 2 ci-après (le schéma global détaillé de la transformation est également proposé en Annexe 1 qui pourra ainsi profitablement être consultée en support à la discussion, pour plus de clarté). Comme mentionné dans le chapitre bibliographique, la présente mise en œuvre est la plus ambitieuse et la moins décrite parmi les réactions chémoenzymatiques, notamment du fait qu'elle exige un maximum de compatibilité chimiques et réactionnelles entre tous les composants du système.

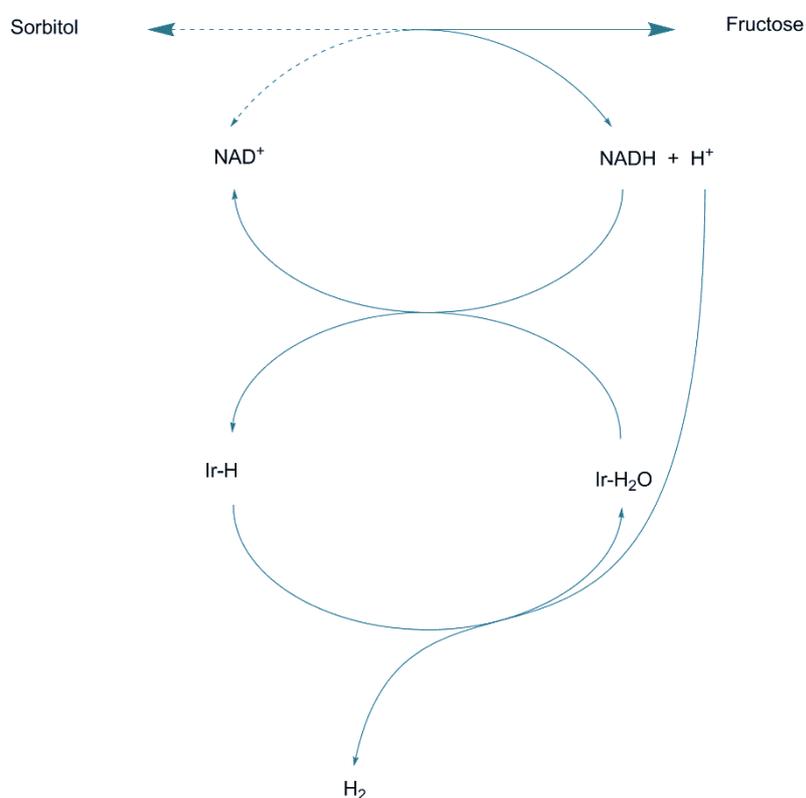


Figure 2 Système hybride étudié pour la transformation du sorbitol, les flèches en pointillés représente la capacité de l'enzyme à effectuer la réaction la réduction du fructose en sorbitol en présence du NADH, dans certaines conditions opératoires (cf chapitre 2)

Dans le chapitre 2, nous avons vu que les deux enzymes présentent des modes de fonctionnement différents. La SDH est une enzyme possédant un site actif à base de zinc tandis que la MDH possède deux sites actifs et permet le transfert d'hydrogène entre l'hexitol (mannitol ou sorbitol) et le cofacteur par interactions de type « liaisons hydrogènes ». Les deux enzymes ont une activité dans des zones de pH proches avec une zone élargie pour la SDH dans le sens réactionnel étudié ici.

L'étude menée dans ce chapitre permettra entre autres de mettre en évidence des différences de comportement entre les deux enzymes au sein d'un système hybride.

I Résultats

En complément des tests expérimentaux de référence réalisés dans les chapitres 2 et 3, il nous reste à vérifier que le complexe organométallique est inactif vis-à-vis du fructose et de l'hexitol (sorbitol ou mannitol selon l'enzyme) pour nous assurer que seule l'enzyme est responsable de la conversion du substrat.

Deux solutions contenant, d'une part, l'hexitol et le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, et, d'autre part, le fructose et le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ en quantités stœchiométriques (20 mM chacun) ont été préparées puis placées sous agitation à 37 °C pendant 2 heures. Les quantités de fructose et d'hexitol ont ensuite été déterminées par chromatographie en phase liquide. Aucune conversion de substrat fructose ou hexitol n'a été constatée en présence du complexe, les concentrations après 2 heures restant identiques à leurs concentrations initiales. On pourra donc ultérieurement attribuer à l'enzyme déshydrogénase toute conversion de l'hexitol de départ et/ou du fructose formé.

Notons qu'il convient de prêter une attention particulière au mode de calcul du rendement en fructose pour la mise en œuvre système hybride. Lorsque les réactions enzymatiques non couplées à la catalyse chimique sont réalisées, le rendement (ou la conversion) est calculé par rapport au réactif limitant, lequel est le cofacteur NAD^+ . Or, dans le cas d'un système hybride, la régénération du cofacteur ayant lieu, le réactif « limitant » devient donc l'hexitol. Ainsi, dans ce chapitre, nous avons fait le choix de calculer les rendements en fructose par rapport au taux de transformation du polyol, comme pour une réaction chémocatalysée classique.

1 Compatibilité enzyme-complexe $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})\text{-H}_2\text{O}$

Pour évaluer la faisabilité d'un système hybride, et donc étudier la compatibilité entre le catalyseur enzymatique et le catalyseur organométallique, nous avons réalisé une expérience où le sorbitol était mis en présence de l'enzyme SDH et du complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$. Cependant, au lieu de fournir à l'enzyme le cofacteur NAD^+ attendu, nous avons démarré le test avec le cofacteur sous sa forme réduite, le NADH. Ainsi, dans ce cas, l'enzyme ne peut opérer la déshydrogénation du sorbitol en fructose uniquement si le complexe organométallique a été capable de convertir le NADH en NAD^+ requis pour l'enzyme (Figure 3).

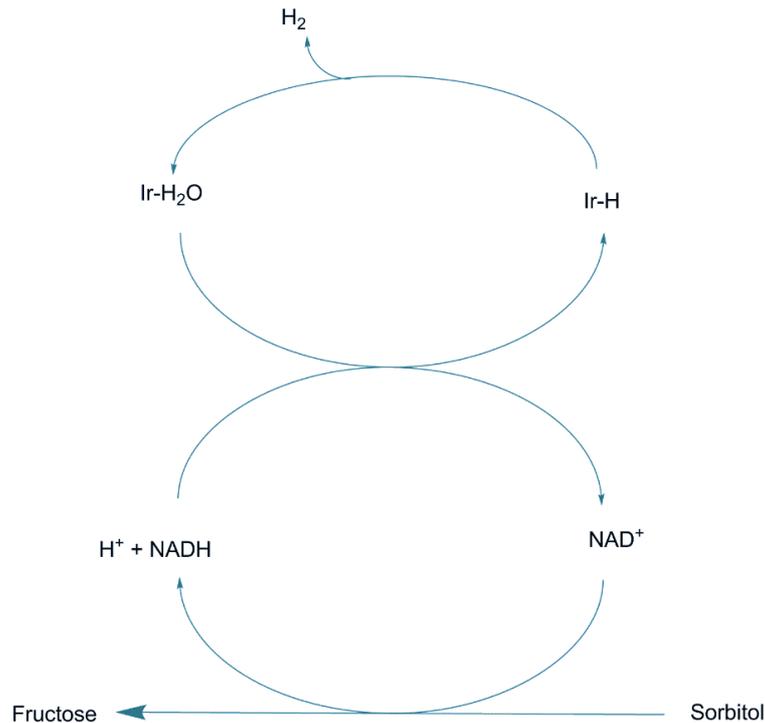


Figure 3 Système hybride étudié pour la transformation du sorbitol à partir de NADH

Si nous détectons du fructose dans le milieu à la suite de ce test, cela montrera que :

- le complexe est en mesure d'oxyder NADH en NAD^+ en présence de l'enzyme ;
- l'enzyme est en mesure de convertir le sorbitol en fructose en présence du complexe organométallique en exploitant le cofacteur NAD^+ fourni concomitamment par le complexe.

Les résultats de cette expérience pour les deux enzymes sont résumés dans le Tableau 1, accompagnés des résultats de toutes les réactions de contrôle nécessaires. La dernière ligne correspond au test hybride avec le mannitol comme substrat. Les conditions opératoires sont précisées sous le tableau. Notons bien que, pour le test hybride, le cofacteur et le complexe sont en quantités stœchiométriques.

Tableau 1 Rendement des tests hybrides et des réactions de contrôle

Exemples	Charge	Composition catalytique	Rendement fructose
Contrôle 1	Sorbitol	Complexe + NADH	0%
Contrôle 2	Sorbitol	Sorbitol déshydrogénase + Complexe	0%
Contrôle 3	Sorbitol	Sorbitol déshydrogénase + NADH	0%
Hybride	Sorbitol	Sorbitol déshydrogénase + NADH + Complexe	5%

Hybride	Mannitol	Mannitol déshydrogénase + NADH + Complexe	5%
----------------	----------	---	----

$[Hexitol] = 120 \text{ mM}$; $Enzyme = 50 \text{ U/L}$; $[NADH] = 2 \text{ mM}$; $tampon \text{ tétraborate } (9,2) = 150 \text{ mM}$; $[Cp^*Ir(phen)(H_2O)]^{2+} = 2 \text{ mM}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $agitation : 650 \text{ rpm}$, $t = 2 \text{ h}$

- Contrôle 1 : Correspond à un test contrôle du chapitre 3 avec NADH en plus. On observe par RMN ^1H la formation de NAD^+ mais le sorbitol reste non converti en l'absence d'enzyme ;
- Contrôle 2 : Valide la nécessité de la présence du cofacteur pour déshydrogéner le sorbitol ;
- Contrôle 3 : Valide la nécessité de générer NAD^+ pour déshydrogéner le sorbitol, et donc la nécessité de réaliser ce test avec le complexe en catalyse hybride pour produire du fructose.

Comme attendu, aucun test de contrôle ne produit de fructose à partir de sorbitol. La présence simultanée de l'enzyme et du complexe organométallique lors de la mise en œuvre en test hybride est indispensable pour la production fructose, que nous quantifions à hauteur de 5% de rendement pour le test hybride sorbitol ou mannitol. Ainsi, nous pouvons en conclure que le complexe organométallique a produit le cofacteur nécessaire à l'enzyme pour que cette dernière puisse effectuer la réaction de déshydrogénation.

Le faible rendement peut être expliqué par une inhibition croisée entre les deux catalyseurs, le complexe organométallique pouvant interagir sur une multitude de sites fonctionnels de l'enzyme. Cet aspect avait déjà été proposé par le groupe de Süß-Fink avec les complexes $[Cp^*Rh(phen)H]$ lors de la régénération de NADH à partir de NAD^+ . Un déséquilibre cinétique entre la réaction de déshydrogénation (production de NADH), la conversion de NADH pour régénérer NAD^+ et la régénération de l'espèce active $\text{Ir-H}_2\text{O}$ à partir de l'espèce Ir-H peut aussi être à l'origine des faibles performances du système. Un tel déséquilibre cinétique pourrait favoriser des voies de dégradation parallèles à partir de l'accumulation d'un intermédiaire réactionnel.

Nous avons vu dans l'étude mécanistique que la régénération de l'espèce active du complexe $\text{Ir-H}_2\text{O}$ à partir de l'hydrure nécessitait la protonation du complexe. La sorbitol déshydrogénase ayant un pH de travail optimal autour de 8,5, la concentration en ions hydronium pourrait être à un niveau bien trop faible pour espérer une cinétique suffisante et rendre l'ensemble réellement productif. Ainsi, les faibles rendements pourraient s'expliquer par un déséquilibre cinétique entre la réaction enzymatique et la réaction de régénération du cofacteur. Nous avons donc entrepris d'optimiser les conditions opératoires, notamment en faisant varier les concentrations des substrats (hexitol, NAD^+) et du catalyseur organométallique, ainsi qu'en modifiant la salinité, et donc indirectement le pH de la solution, en jouant, par exemple, sur la présence ou non de tampon, ainsi que l'ajout de base ou d'acide.

2 Optimisations hybrides

L'optimisation des tests hybrides se fera désormais en présence de NAD^+ comme cofacteur au départ de la réaction, en effet c'est le cofacteur nécessaire à l'enzyme pour l'oxydation du sorbitol en fructose. Dans le paragraphe 2.1 suivant, les manipulations ont été réalisées avec les deux enzymes séparément menant aux mêmes conclusions. Pour éviter trop de répétition, nous présentons ici les résultats avec l'enzyme MDH.

2.1 Variation de la concentration de complexe

Le complexe organométallique qui doit assurer la régénération de NAD^+ a été ajouté en quantité stœchiométrique (20 mM) ou catalytique (2 mM) par rapport au NAD^+ (20 mM). Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 Conversion de mannitol obtenue par la réaction enzymatique et le système hybride en faisant varier la concentration de complexe organométallique

Test	Concentration en complexe $\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})\text{-H}_2\text{O}$	Conversion de mannitol
1	0 mM	6%
2	2 mM	8%
3	20 mM	13%

Conditions : $\text{MDH} = 50 \text{ U.L}^{-1}$; $[\text{mannitol}] = 120 \text{ mM}$; $[\text{NAD}^+] = 20 \text{ mM}$; tampon : 150 mM (pH 9,2) ; $t = 20 \text{ min}$.

Les conversions de mannitol étant faibles, on peut se demander si le NAD^+ a été régénéré après avoir réalisé un premier turnover d'oxydation du sorbitol en fructose. En effet, l'ajout du complexe dans le milieu doit permettre la régénération du cofacteur, et ainsi permettre à l'enzyme d'exploiter catalytiquement le cofacteur. Pour savoir si le complexe a régénéré plusieurs fois le NAD^+ à partir du NADH produit par l'enzyme, il est possible de calculer la conversion comme si le NAD^+ était le réactif limitant. Si la conversion calculée obtenue est supérieure à 100%, nous pourrions conclure que l'enzyme aura eu à disposition une quantité de NAD^+ supérieure à la quantité initiale fournie et que par conséquent, le complexe organométallique aura assuré son rôle de régénération. Nous avons transposé les résultats en conversion par rapport au NAD^+ dans la Figure 4.

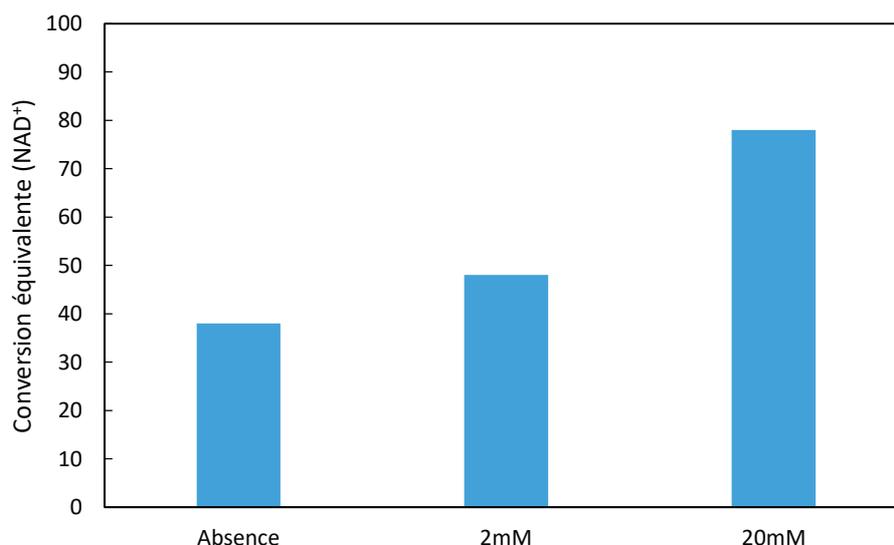


Figure 4 Conversion de NAD⁺ du système hybride en fonction de la concentration de complexe dans le milieu. Mêmes conditions que pour le Tableau 2

D'après la figure 3, aucune des conversions équivalentes en NAD⁺ ne montre que le complexe a oxydé NADH pour régénérer NAD⁺ afin que l'enzyme exploite ce dernier pour transformer le sorbitol en fructose. Ces faibles taux peuvent être liés à une zone de pH compatible trop étroite entre l'enzyme et le complexe. En effet, la concentration de protons dans ce milieu à un pH de 9,2 étant de $10^{-9,2}$ M, il est évident que la conversion de la forme $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})\text{H}]^+$ hydrure du complexe en la forme active $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ par protonation du complexe et dégagement d'hydrogène n'est que très peu favorisée. Ceci explique bien la faible augmentation de la conversion d'hexitol lors de l'introduction du complexe.

On peut par ailleurs observer que la conversion de NAD⁺ n'est que faiblement promue par l'utilisation d'une concentration de complexe plus élevée (Test 2 et 3 du Tableau 2 entre 2 et 20 mM). Ceci est en accord avec notre hypothèse concernant l'insuffisance de protons accessibles dans le milieu pour régénérer le complexe. En effet, même si le complexe est capable de régénérer le NAD⁺ à partir du NADH, le peu de protons disponibles dans le milieu ne lui permet pas de boucler le cycle catalytique et ainsi produire l'espèce active du complexe en libérant du dihydrogène. De fait, le complexe ne pouvant pas faire plus d'un turnover, le cofacteur NAD⁺ n'est régénéré qu'une seule

fois et non catalytiquement. Le schéma de la réaction devient donc celui présenté en

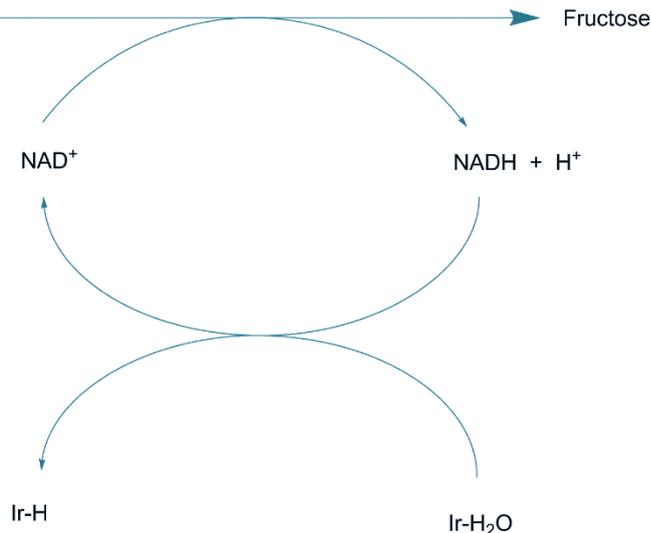


Figure 5.

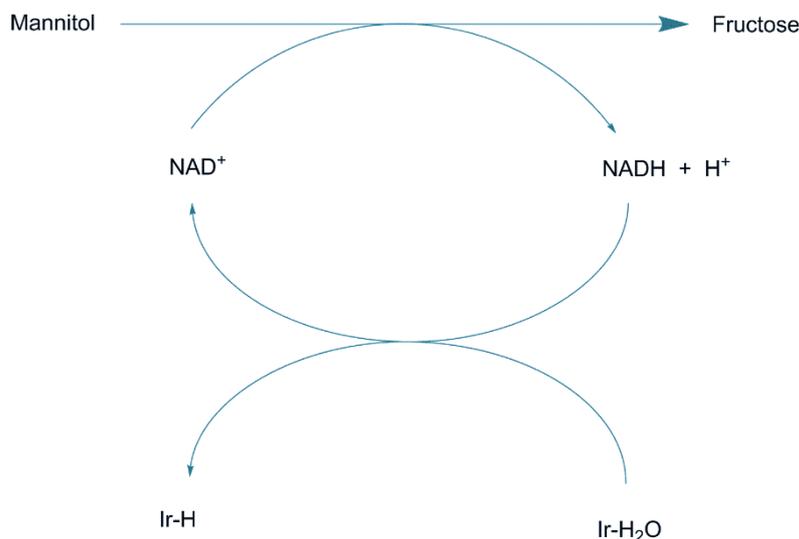


Figure 5 Système hybride pour la transformation de mannitol sans régénération de l'espèce active du complexe organométallique

Par conséquent, l'ajout d'une certaine quantité de complexe revient à ajouter la même quantité de NAD^+ . Si l'on considère 22 mM (20 mM de NAD^+ + 2 mM de complexe organométallique) et 40 mM (20 mM + 20 mM) de NAD^+ dans les deux tests hybrides du Tableau 2, la conversion de NAD^+ ramenée à ces valeurs de départ simulées est à peu près de 40%, valeur du test enzymatique seul, contre 48% et 78% observés expérimentalement. Ainsi on ne tire aucun effet de l'ajout du complexe organométallique en tant que catalyseur car l'espèce active $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$ ne peut pas être régénérée à partir de $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})\text{H}]^+$

Dans nos expériences, l'enzyme, en présence de 20 mM de NAD^+ et de 2 mM de complexe organométallique convertit la même quantité de mannitol qu'en présence de 22 mM de NAD^+ . Nous pouvons constater que l'on atteint dans chacune des expérimentations le rendement théorique de conversion du mannitol, ce qui suggère une absence d'inhibition entre les deux catalyseurs. Par conséquent, l'enzyme n'est pas inhibée par la présence de complexe organométallique en grande quantité dans la solution.

Les faibles rendements semblent être liés au pH de la solution, trop basique pour permettre au complexe hydrure de reformer le complexe actif et donc, trop basique pour permettre de régénérer le cofacteur de manière catalytique. Dans ce cas, on peut se poser la question de la pertinence de l'introduction d'une solution tampon dans le système hybride, tampon classiquement employé en catalyse enzymatique. Pour la réaction enzymatique seule, le tampon introduit en quantité importante permet de capter les protons libérés par l'enzyme ($\text{NAD}^+ + \text{substrat}(-\text{H}_2) \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{produit}$) lors de la réaction de déshydrogénation pour maintenir un pH de travail optimal à l'enzyme et ne pas acidifier le milieu. Cependant, le fait de tamponner le milieu peut rendre difficile la protonation du complexe pour régénérer l'espèce active du complexe organométallique. De plus, la régénération catalytique du cofacteur peut consommer les protons produits par la réaction enzymatique, ce qui pourrait permettre de travailler en circuit fermé de protons : l'enzyme produit le proton nécessaire à la régénération de la forme active du complexe organométallique. Nul besoin alors dans un cas idéal de travailler en milieu tamponné, c'est le complexe organométallique qui peut jouer ce rôle.

2.2 Tests hybrides sans solution tampon

Pour confirmer cette hypothèse, de nouveaux tests hybrides ont été réalisés en l'absence de solution tampon. Le substrat, le cofacteur et le complexe organométallique sont mis ensemble en solution puis le pH de cette solution est ajusté à la valeur désirée à l'aide d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium dilué. Lorsque le pH est stabilisé, l'enzyme est ajoutée. Pour ces tests, nous avons utilisé l'enzyme SDH car elle présente une fourchette de pH de travail plus large que la MDH, notamment pour les valeurs plus basses de pH qui nous intéressent pour la régénération du complexe organométallique.

Nous savons que la réaction enzymatique libère une mole de proton dans le milieu par mole de substrat hexitol converti *via* la réduction du cofacteur NAD^+ . Nous supposons que la conversion de la forme $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})\text{H}]^+$ du complexe organométallique doit être protonnée pour en régénérer la forme active $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$. Si le complexe possède une activité plus élevée ou égale à celle de l'enzyme, le pH devrait se maintenir à sa valeur initiale. Dans le cas contraire, le pH de la solution

devrait diminuer par libération d'un proton par mole de NAD^+ réduite. Il faudra dans ce cas être attentif à maintenir un pH auquel l'enzyme peut effectivement réaliser la déshydrogénation du polyol en fructose et non la réaction inverse (qui a lieu pour des pH inférieurs très proches de 7,5). Nous avons vu dans le Chapitre 2 que l'enzyme SDH développe une activité relativement élevée même à des pH autour de 8,5 tandis que la MDH possède une zone de pH optimale très restreinte autour de 8,7 pour effectuer la déshydrogénation du mannitol en fructose.

L'évolution des pH a été enregistrée au cours de la réaction hybride sans solution tampon à l'aide d'une sonde pH-métrique placée dans le milieu. La précision de la mesure de la sonde est de 0,2 unité pH. Les évolutions des pH pour la réaction hybride et la réaction enzymatique sont présentées Figure 6 pour l'enzyme SDH.

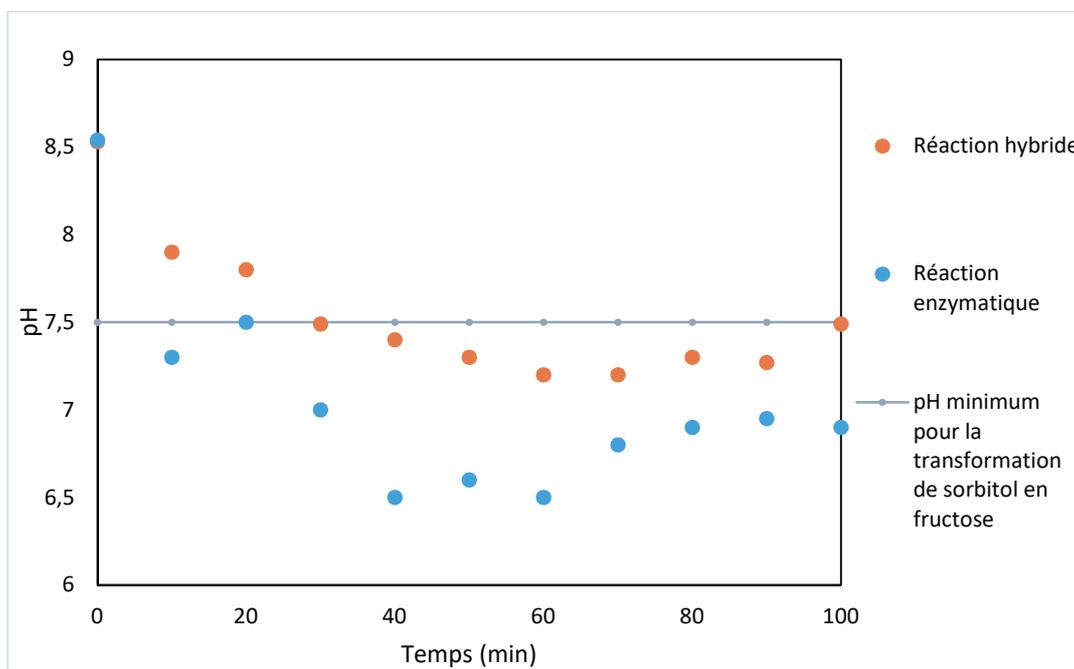


Figure 6 Evolution du pH de la réaction enzymatique (en bleu) et du système hybride (en orange) en l'absence de solution tampon. Conditions : $\text{SDH} = 50 \text{ U.L}^{-1}$; $[\text{sorbitol}] = 120 \text{ mM}$; $[\text{NAD}^+] = 20 \text{ mM}$; $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+} = 2\text{mM}$

On remarque sur la première heure de réaction une acidification des solutions en l'absence de tampon, que ce soit pour la réaction enzymatique seule ou pour la mise en œuvre hybride. La diminution du pH est tout de même plus faible dans le cas de la réaction hybride mais elle est bien présente et significative. Ceci reflète le fait que la cinétique de réaction du complexe organométallique est plus lente que celle de l'enzyme. Comme la SDH est en mesure d'effectuer la réaction inverse à un pH inférieur à 7,5 en catalysant la réduction du fructose en sorbitol, la transformation visée n'est plus possible et le sorbitol initialement converti est reformé lorsque le pH diminue. Nous sommes donc devant un défi de taille : travailler à un pH le plus acide possible pour

favoriser la régénération de l'espèce active du complexe sans passer sous de la barre de 7,5 pour maintenir une activité enzymatique convenable (Tableau 3 - Test 2).

Comme une acidification du milieu est observée et que nous avons montré dans les parties précédentes la nécessité de protons pour la régénération du complexe organométallique, nous avons également réalisé un test dans lequel le complexe organométallique est ajouté 20 minutes après le début de la réaction enzymatique. En effet, après 20 minutes de réaction enzymatique seule, le pH de la solution a déjà diminué d'une unité pH (Figure 5 points bleus) et est à la limite de la fourchette de pH permettant à l'enzyme d'effectuer la réaction inverse. Ainsi, après 20 minutes de réaction, une plus grande accumulation de protons dans le milieu sera favorable à la réaction catalysée par le complexe organométallique. Les résultats de ces différentes expériences sont reportés dans le Tableau 3. De même que pour la Figure 3, la conversion a été calculée en considérant que le NAD^+ était le réactif limitant. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 3. Cela nous permettra de voir si la régénération de NAD^+ par le complexe d'iridium a effectivement pu se mettre en place.

Tableau 3 Conversion de sorbitol et conversion calculée de NAD^+ pour différents tests enzymatiques et hybrides sans solution tampon

Tests	Temps (min)	Conversion de sorbitol	Conversion calculée du NAD^+
1. Enzymatique	20	8%	48%
	40	2%	12%
2. Enzymatique ^a	20	7%	42%
	40	13%	78%
3. Hybride	20	13%	78%
	40	9%	54%
4. Hybride ^b	20	7%	42%
	40	28%	168%

^a Ajustement du pH avec du NaOH toutes les 5 minutes ; ^b addition du complexe 20 minutes après ajout de l'enzyme ; Conditions : $SDH = 50 \text{ U.L}^{-1}$; $[\text{sorbitol}] = 120 \text{ mM}$; $[\text{NAD}^+] = 20 \text{ mM}$; $[\text{complexe}] = 2 \text{ mM}$; pH de départ : 8,5

Pour la réaction 1. Enzymatique, on constate une diminution de la conversion entre 20 minutes et 40 minutes, cette évolution étant due à la réversibilité de la réaction enzymatique en fonction du pH du milieu qui permet la réaction inverse de réduction du fructose en sorbitol au pH atteint. Le système atteint ensuite un équilibre.

Lorsque le pH est ajusté dans la réaction 2. enzymatique, cette réversibilité n'est plus observée et la conversion augmente entre 20 et 40 minutes de réaction. La conversion atteint une valeur normalement obtenue dans un test enzymatique en présence de solution tampon.

Lorsque le complexe organométallique est ajouté, les conversions obtenues en sorbitol sont légèrement plus élevées que pour le test 1. Enzymatique grâce à l'activité de régénération de NAD^+ du complexe. En effet, le complexe organométallique déplace l'équilibre en effectuant la régénération du cofacteur NAD^+ . On peut se demander cependant pourquoi le rendement atteint n'est pas plus important. Cela peut être dû à un problème d'adéquation des cinétiques entre la réaction de régénération et les réactions parallèles ou de dégradation. Dans le test 4. hybride, la conversion obtenue à 20 minutes est proche de celle observée pour le test 1 car le complexe n'est ajouté dans le milieu qu'après 20 minutes. Après 20 minutes supplémentaires, la conversion atteint un niveau bien plus élevé que celui de tous les autres tests avec une valeur de conversion de NAD^+ supérieur à 100%. Par conséquent, le complexe d'iridium a bel et bien été en mesure de régénérer NAD^+ à partir du NADH formé in-situ et de fournir à l'enzyme une quantité globale de cofacteur supérieure à la quantité initiale fournie.

Les valeurs des conversions de sorbitol en fructose sont très encourageantes. Le complexe a effectué plusieurs régénérations de cofacteur avec une cinétique plus rapide grâce à un pH de la solution plus faible au moment de l'ajout de ce dernier, aboutissant ainsi à une augmentation appréciable du rendement en fructose. Dans le cas de la réaction enzymatique seule avec le tampon, le rendement obtenu est de 6% tandis qu'on obtient 28% de rendement dans le test 4. Cependant, le pH du test 4. Hybride à 40 minutes est de 7,4. A ce pH, la réaction favorisée pour l'enzyme est la réduction du fructose en sorbitol. Par conséquent, on en déduit que le système atteint ses limites concernant le maintien du pH et la régénération du cofacteur est stoppée car l'espèce active $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ ne peut plus être reformée à partir de $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})\text{H}]^+$

Afin d'obtenir des rendements plus importants, il est possible de modifier les rapports molaires entre le substrat et le duo cofacteur/complexe organométallique, notamment pour compenser les différences cinétiques et ainsi indirectement mieux contrôler la concentration en protons du milieu. Or, notre stratégie de recherche portant sur l'utilisation de quantités catalytiques de cofacteur nous n'avons pas souhaité étudier ce paramètre.

A la suite de ces premières tentatives d'optimisation avec le complexe de référence $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, nous avons exploité tout le travail expérimental et théorique réalisé dans les chapitre 2 et 3 pour mettre à profit le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen}2\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ ayant montré les meilleures performances pour la régénération du NAD^+ . Les résultats sont présentés dans le paragraphe suivant.

3 Catalyse hybride intégrant le complexe organométallique le plus performant

Lors du screening de ligands de type phénantroline réalisé dans le chapitre 4, le complexe portant la phénantroline dichlorée a montré une cinétique de régénération du cofacteur NAD^+ plus rapide avec une sélectivité accrue. Des tests hybrides ont donc été réalisés avec ce complexe. Il faut noter que l'ajout de composés halogénés, ici contenant des atomes de chlore dans le système hybride pourrait avoir un impact indésirable et entraîner des phénomènes d'inhibition supplémentaires des catalyseurs par rapport au complexe de référence.

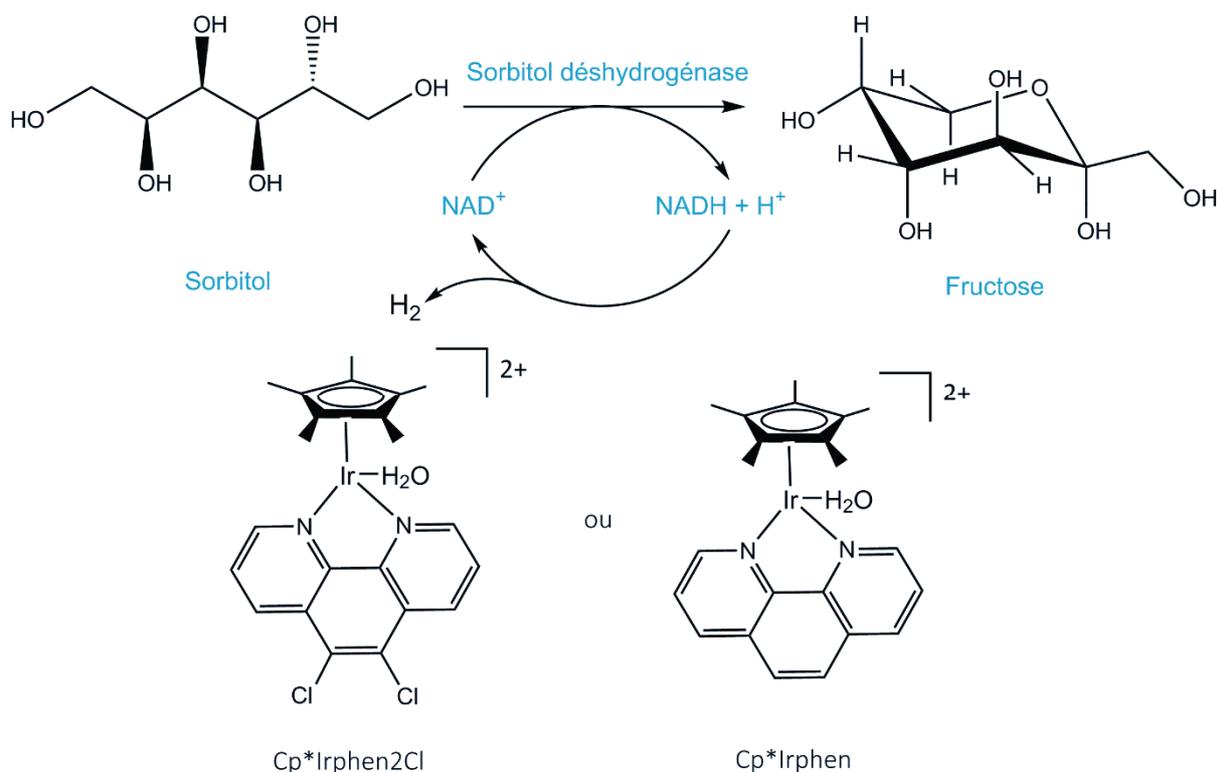


Figure 7 Complexes organométalliques utilisée dans les essais de catalyse hybride

Tableau 4 Comparaison de deux complexes organométalliques en catalyse hybride

	Temps (min)	Conversion
Enzyme	20	8%
	40	2%
1. Cp^*Irphen	20	13%
	40	9%
2. $\text{Cp}^*\text{Irphen2Cl}$	20	15%
	40	16%

*Conditions : SDH = 50 U.L⁻¹ ; [sorbitol] = 120 mM ; [NAD⁺] = 20 mM ;
[complexe] = 2 mM, pH de départ : 8,5*

L'ajout d'un complexe possédant le ligand phénantroline dichlorée permet d'obtenir un rendement légèrement plus élevé. Dans la réaction 1, après 40 minutes de réaction, le rendement en fructose a diminué. Dans le paragraphe précédent, nous avons interprété cela comme un retour à l'équilibre de la part de l'enzyme qui a suffisamment de NADH dans le milieu et un pH suffisamment acide pour lui permettre de faire la réaction inverse. Dans le cas de la phénantroline dichlorée, le rendement est stable, voire a très légèrement augmenté. Le complexe dichloré serait donc plus rapide pour régénérer le cofacteur et permettre la consommation de protons produits par l'enzyme. Il est donc possible de maintenir le pH plus longtemps dans la zone d'activité de conversion du sorbitol en fructose et induire un rendement plus élevé en fructose. Ces résultats en catalyse hybride sont en total adéquation avec les performances en catalyse chimique seule décrites au chapitre précédent pour le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir-phen2Cl}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$.

La cinétique de régénération du NAD⁺ par le complexe est donc critique pour la productivité et la stabilité du système hybride : le catalyseur chimique semble donc être le catalyseur cinétiquement limitant pour obtenir une synergie optimale entre les deux systèmes.

L'évolution du pH lors de la réaction hybride a été enregistrée, elle est reportée en Figure 8.

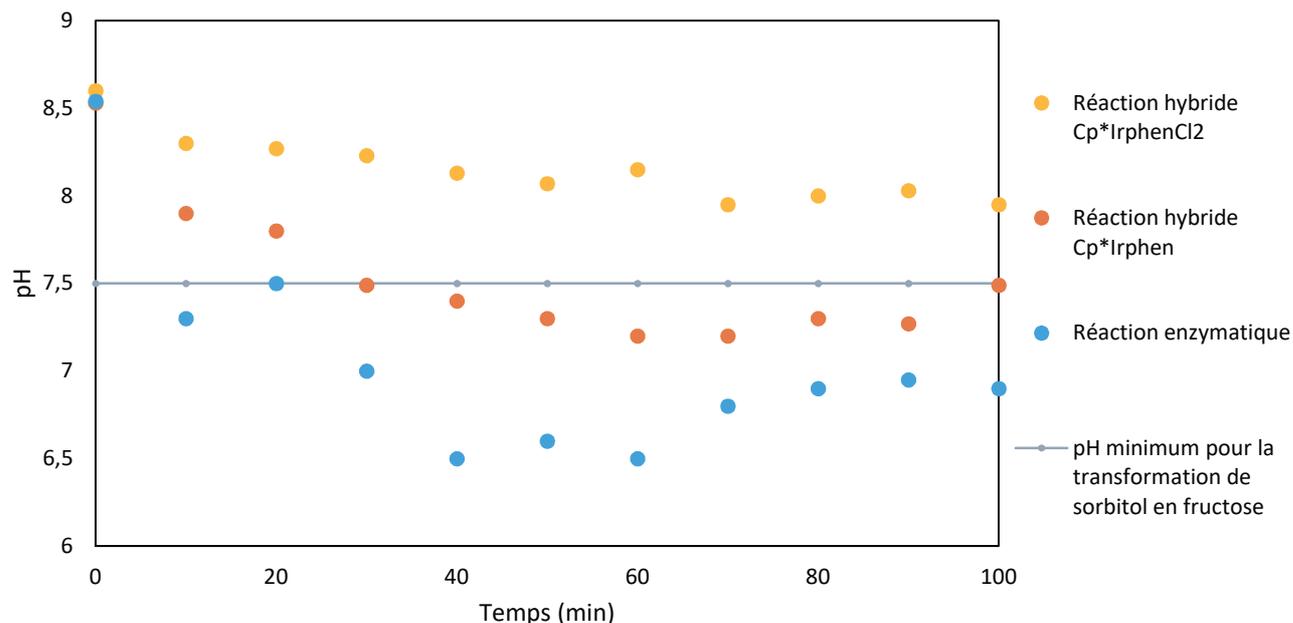


Figure 8 Evolution du pH pour les réactions hybrides avec le complexe CpIrphen2Cl (en gris), avec le complexe Cp*Irphen (en orange) et pour la réaction enzymatique (en bleu) en l'absence de solution tampon

La solution est moins acidifiée au cours du temps dans le cas de la réaction hybride avec le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{phen}2\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ avec le maintien à un pH supérieur à 7,5. Ces résultats sont en accord avec une consommation plus rapide par le complexe des protons produits par l'enzyme, permettant ainsi d'obtenir un rendement en fructose plus important et empêchant la réaction enzymatique inverse d'hydrogénation du fructose.

Ainsi, le complexe portant une phénantroline dichlorée constitue un catalyseur chimique particulièrement intéressant pour la mise en œuvre du système hybride. Un ajout de celui-ci 20 minutes après le début de la réaction devrait permettre d'obtenir de meilleurs rendements mais n'a pas pu être mis en œuvre avant la finalisation de ce manuscrit. De même, il pourrait être intéressant d'introduire l'enzyme et le sorbitol avec un système de goutte à goutte. Un ajout progressif de l'enzyme pourra limiter la cinétique de production de NADH et ainsi laisser le temps au complexe de régénérer le NAD^+ .

II Discussion

1 Systèmes développés

La stratégie développée dans cette thèse pour démontrer l'intérêt d'une catalyse hybride combinant catalyseurs enzymatique et chimique s'est basée sur la conversion quantitative d'hexitol (Sorbitol, Mannitol) en fructose. Au niveau industriel, le fructose est obtenu aujourd'hui par conversion enzymatique du glucose par l'action d'une xylose isomérase. Cette enzyme permet une transformation du glucose jusqu'à un équilibre thermodynamique avec une composition finale d'environ 50/50 entre le glucose et le fructose. Cet équilibre implique de mettre en place des procédés de séparation chromatographiques énergivores pour obtenir des sirops composés d'une majorité de fructose, les plus concentrés contiennent 90% de fructose et 10% de glucose. L'obtention d'un sirop de fructose pur implique des volumes gigantesques de colonnes de lits mobiles simulés non rentables économiquement, d'autant que la visée marché première est l'agroalimentaire pour lequel des sirops purs ne présentent pas d'intérêt.

Au travers d'une étude poussée intégrant deux enzymes modèles et des complexes organométalliques optimisés, nous avons initié un nouveau système basé sur l'utilisation d'un intermédiaire hexitol issu de l'hydrogénation chimique du glucose. L'utilisation de sorbitol déshydrogénase et mannitol déshydrogénase permet la déshydrogénation sélective du sorbitol et du mannitol, respectivement, en fructose à l'aide de cofacteurs NAD^+ . La régénération de ce cofacteur à l'aide d'un complexe organométallique n'aboutit toutefois pas à une transformation quantitative de l'hexitol en fructose et la production de dihydrogène comme seul co-produit. La mise en œuvre de tels systèmes catalytiques hybrides exigent donc encore de nombreux travaux pour être plus performantes.

A terme, l'optimisation d'un tel système permettrait toutefois de limiter les étapes de séparation liées aux co-produits actuellement présent dans les procédés industriels de production de fructose. Par ailleurs, il serait envisageable d'utiliser des sucres et polyols issues de matières premières renouvelables telle que la biomasse lignocellulosique, ressource abondante et qui n'entre pas en compétition avec les filières alimentaires.

Lors de cette étude, il est intéressant de noter que la mise en contact des complexes les plus sélectifs et des enzymes n'a pas engendré d'effets inhibiteurs majeurs sur l'activité respective des catalyseurs. Par ailleurs, il a été mis en évidence que le point crucial pour optimiser cette

association concerne le pH. En effet, pour la production de fructose, l'enzyme fonctionne dans le sens réactionnel souhaité à un pH basique tandis que le complexe a besoin de proton pour régénérer catalytiquement le cofacteur. Lors de la réaction enzymatique de déshydrogénation, un hydrure est transféré sur le NAD^+ pour former NADH et libérer un proton dans le milieu. Une solution tampon est classiquement nécessaire pour le fonctionnement de l'enzyme seule car il permet de capter les protons relargués et ainsi maintenir un pH optimal pour le fonctionnement de l'enzyme. Dans notre cas, le tampon entrave en fait le fonctionnement du complexe en captant ces protons. Il a donc été retiré du milieu pour qu'il ne joue pas le rôle de capteur de proton au détriment du complexe. Malgré des conversions de sorbitol plus élevées, ce retrait s'est fait au détriment de l'enzyme. En effet, la cinétique du complexe étant plus lente que celle de l'enzyme, une accumulation de proton est observée dans le milieu avec une diminution du pH. Ceci permet à l'enzyme d'effectuer la réaction inverse de celle désiré lorsque le pH était devenu trop faible. Dans le cas où le complexe aurait une cinétique de régénération plus importante, la réaction inverse aurait été impossible, car le pH aurait été maintenu et le NADH n'aurait pas été présent.

Malgré des efforts pour obtenir des rendements plus importants en fructose, aucune association ni stratégie n'a permis une réaction quantitative du fait de cette différence de cinétique entre les deux catalyseurs ici étudiés. Cependant, du fait de la nouveauté de ce domaine, de nombreuses perspectives peuvent être proposées pour permettre de lever les nouveaux verrous identifiés.

2 Perspectives

Nous avons mis en évidence le frein principal au développement de notre stratégie, à savoir la compatibilité des pH entre les deux réactions induite par les différences de cinétiques entre la catalyse enzymatique et la catalyse chimique. Pour surmonter ces obstacles nous pouvons agir sur les deux catalyseurs :

- La modification des enzymes pour qu'elles puissent réaliser la réaction à des pH plus acides dans le cas où la cinétique chimique est trop lente ;
- la modification du complexe organométallique permettant la régénération du cofacteur à pH basique ou d'accélérer la régénération du cofacteur au pH de fonctionnement de l'enzyme

De nombreuses stratégies de modifications ou stabilisation des enzymes ont vu le jour ces dernières décennies : par modification génétique de l'enzyme, par immobilisation, par ajout d'un composé de

type protéine dans le milieu. Ces techniques de stabilisation peuvent permettre de modifier les propriétés des souches et les adapter à des pH plus acides.^{1,2} Par exemple, la modification génétique de l'enzyme pourrait modifier le site de fixation du cofacteur et ainsi réduire l'affinité entre le NADH et l'enzyme. Cela aurait pour conséquence de réduire le K_m de l'enzyme pour le NADH et un élargissement de la gamme de pH. Par ailleurs, il est également possible de trouver des stratégies de confinement de l'enzyme dans un environnement basique.³

Lors de ces travaux de thèse, le complexe organométallique de référence étudié dans le chapitre 3 a été substitué par des groupements électroattracteurs dans le chapitre 4, ce qui a permis d'améliorer ses propriétés pour la régénération du cofacteur NAD⁺. L'étude s'est portée sur la modification du ligand phénantroline, cependant ce type de complexe est largement étudié dans la littérature avec de nombreux screenings de catalyseurs dans le cadre de l'oxydation de l'eau.⁴ Ainsi un large panel de complexes reste encore à étudier et à appliquer pour ce système. L'utilisation de complexes équivalents de rhodium ayant montré une bonne activité pour la régénération de NADH couplée à une réaction enzymatique de réduction pourrait également être envisagée.

Nous avons également imaginé une perspective ambitieuse de modification du complexe organométallique pour faciliter sa protonation lors de la libération d'un proton par l'enzyme. Pour ce faire, il peut être important de travailler sur la proximité géographique entre le proton libéré par l'enzyme et le complexe sous sa forme hydrure. En effet, lors de la réaction enzymatique, l'enzyme joue le rôle de transfert d'hydrure entre le polyol et le cofacteur et libère un proton dans le milieu pour terminer la déshydrogénation. Si le complexe est proche du site actif de l'enzyme, il pourra récupérer l'hydrure du NADH et le proton libéré pourra directement être exploité avant d'être neutralisé par un milieu tamponné ou un milieu légèrement basique. Ainsi, on pourrait envisager un greffage du complexe d'iridium directement sur le NAD avec deux approches décrites Figure 9. Premièrement, on se propose d'utiliser la base azotée adénine qui comprend un enchaînement atomique de type N-C-C-N bidentate que l'on pourrait rapprocher du mode de coordination de la phénantroline. La synthèse d'un complexe d'iridium avec un ligand adénine seul (non porté par un cofacteur NAD) a déjà été rapportée dans la littérature.⁵ Deuxièmement, il pourrait être intéressant de fonctionnaliser l'adénine par un linker en substituant l'autre extrémité du linker avec la phénantroline pour y complexer l'iridium.

¹ Ó'Fágáin, C. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, 33 (2-3), 137–149.

² Matulis, D.; Wu, C.; Pham, T. Van; Guy, C.; Lovrien, R. J. *Mol. Catal. - B Enzym.* **1999**, 7 (1-4), 21–36.

³ A. Küchler, M. Yoshimoto, S. Luginbühl, F. Mavelli, P. Walde, *Nat. Nanotech.* **2016**, 11, 409-420.

⁴ N. Mcdaniel, F. Coughlin, L. Tinker, S. Bernhard, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 210-217.

⁵ Molodkin, A. K.; Esina, N. Y.; Kurasova, M. N. *Russ. J. Inorg. Chem.* **2010**, 55, 370–376.

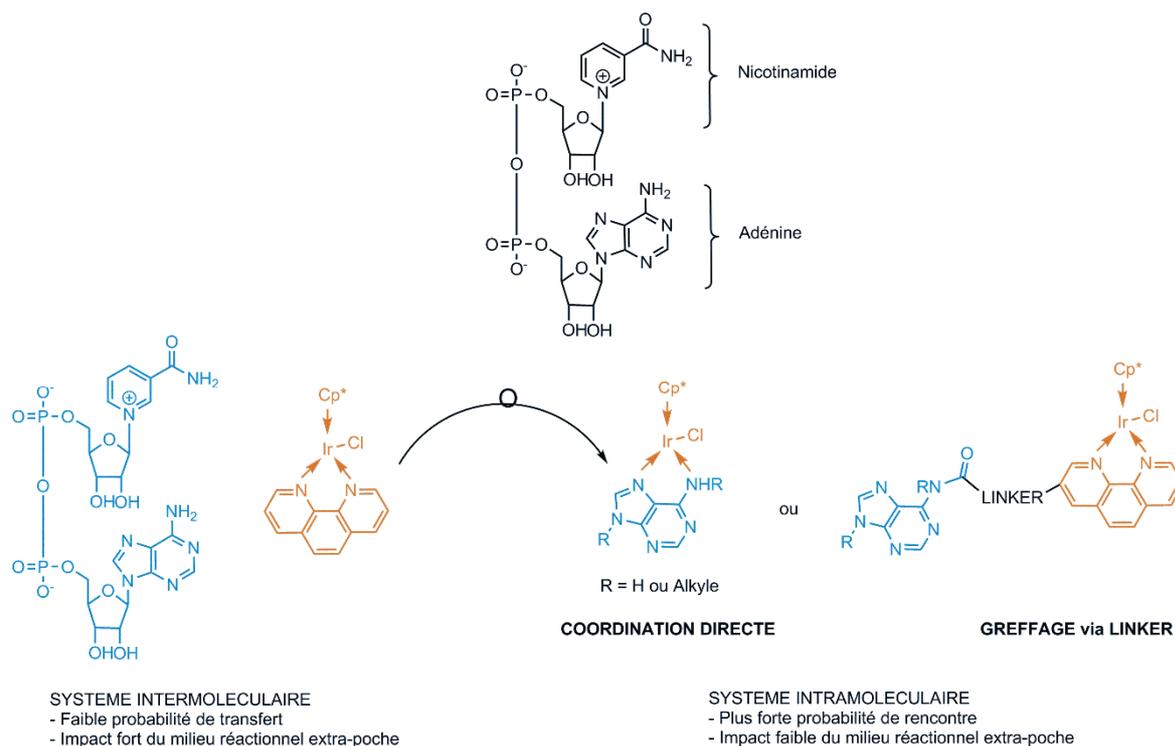


Figure 9 Fonctionnalisation du NAD

Le NAD^+ fonctionnalisé par le complexe d'iridium, sera transformé en NADH fonctionnalisé lors de la réaction enzymatique de déshydrogénation de l'hexitol en fructose comme décrit en Figure 10.

Le développement des perspectives dans la suite de cette partie n'est illustré et exemplifié qu'avec la première proposition de complexer directement l'iridium sur le résidu adénine du NAD.

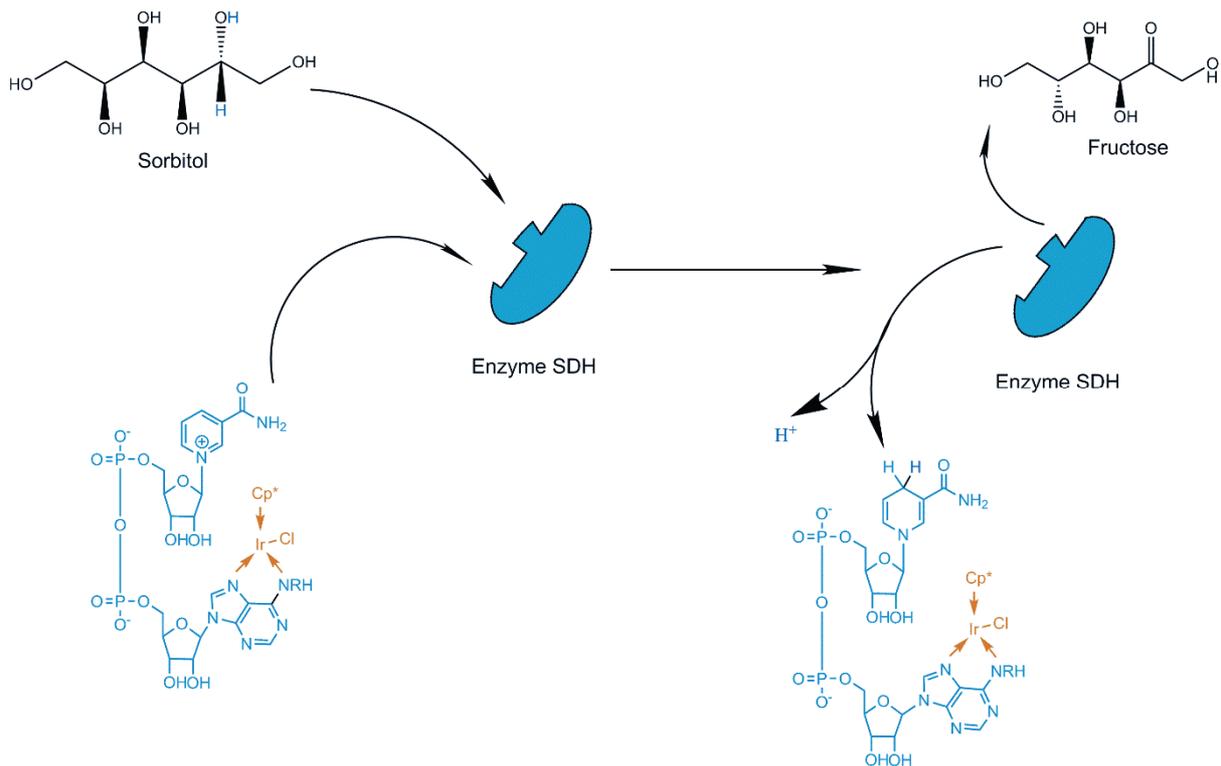


Figure 10 Synthèse hybride du fructose avec le NAD fonctionnalisé sans linker

Comme vu dans le chapitre 3, le transfert d'hydrure entre le cofacteur et l'atome d'iridium a lieu facilement. Par la suite, la formation de H_2 avec le proton libéré puis sa décooordination pourrait avoir lieu au sein de la poche enzymatique (Figure 11).

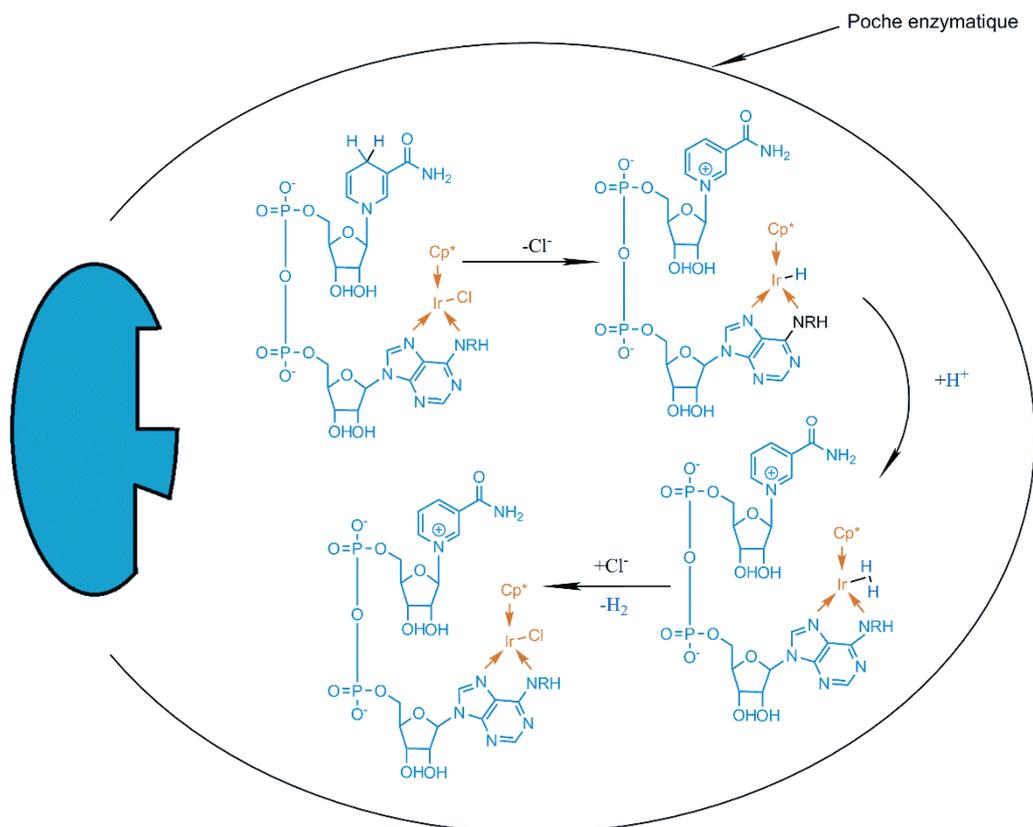


Figure 11 Régénération « double » du cofacteur fonctionnalisé sans linker au sein de la poche catalytique

Cette étape est la clé de l'amélioration du système hybride. En effet, le captage du proton au sein même de la poche enzymatique est très important. Il faut profiter du milieu légèrement plus acide par rapport au proton libéré pour favoriser directement la régénération de l'espèce active du complexe et ainsi maintenir un pH constant favorable à l'activité de l'enzyme. Le schéma global est décrit Figure 12.

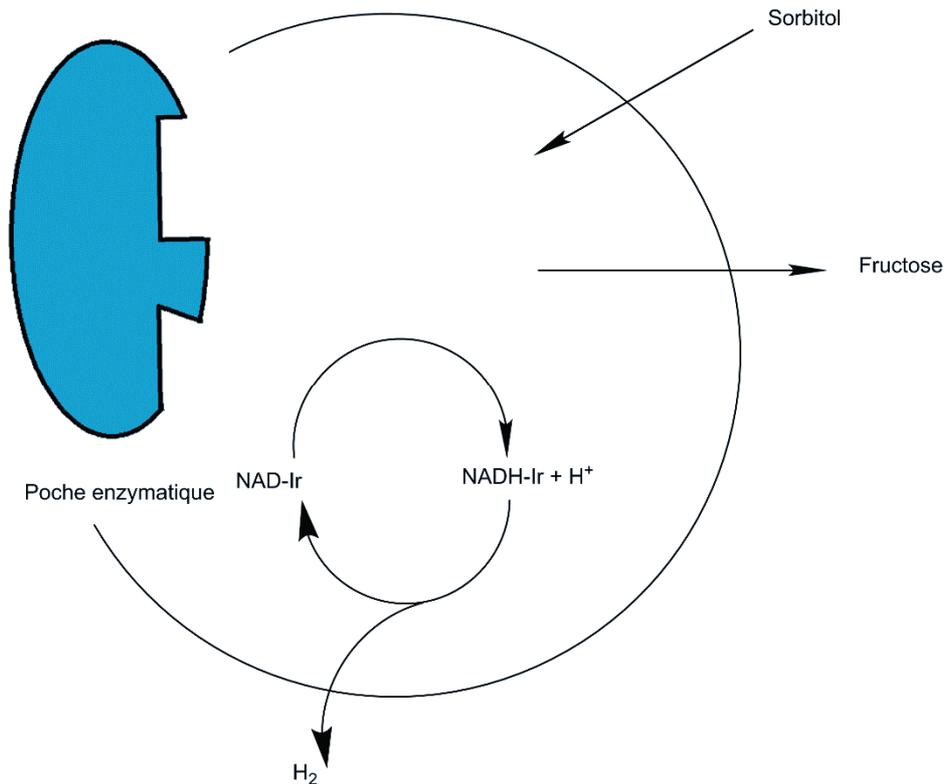


Figure 12 Schéma du système hybride dans la poche enzymatique avec le NAD fonctionnalisé

Deux questionnements majeurs peuvent être mis en évidence pour cette stratégie. Tout d'abord, la synthèse de ce cofacteur fonctionnalisé : la NAD étant sensible à l'augmentation de la température, la synthèse peut s'avérer difficile ou à faible rendement. Ensuite, le point crucial est l'acceptation du cofacteur fonctionnalisé pour l'enzyme. Il est bien connu que les enzymes fonctionnent sur le principe de clé-serrure, et, par conséquent, une modification structurale de l'enzyme peut engendrer une désactivation totale de l'enzyme. Dans le cas où le résidu adénine revêt une importance dans la reconnaissance du NAD par l'enzyme, alors le cofacteur ne sera plus reconnu par l'enzyme. L'étude structurale de la SDH par Yennawar *et coll.* peut nous permettre de mettre en évidence les interactions entre le site actif de l'enzyme et le cofacteur.⁶ La poche catalytique est large et peut s'accommoder de substrat à chaîne plus large et il n'y a pas d'interaction directe par liaisons hydrogènes entre le résidu adénine du NAD et les acides aminés de reconnaissance de l'enzyme. Par conséquent, elle pourrait également laisser agir le complexe iridium. Si on regarde les interactions enzyme-substrat-NAD-Zinc, on peut voir que l'atome de Zinc est indispensable pour la réaction et la stabilisation des substrats.

⁶ H. Yennawar, M. Møller, R. Gillilan, N. Yennawar, *Acta Cryst.*, **2011**, D67, 440–446

La Figure 13 nous permet de voir que le sorbitol a besoin de 4 acides aminés, du zinc et du NAD (interaction entourée en rouge) pour être stabilisé. Dans le cas de l'enzyme de foie de mouton, le NAD ne vient pas forcément se fixer en premier par rapport au substrat.

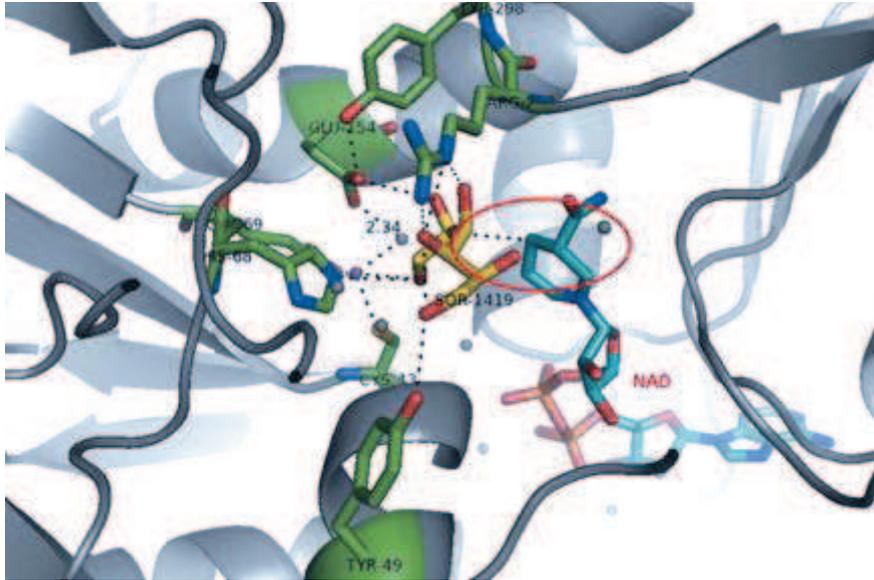


Figure 13 Interactions enzyme-substrat-NAD-Zinc pour l'enzyme SDH de foie de mouton avec l'interaction substrat-NAD entourée en rouge

Par ailleurs la partie adénine est éloignée du site actif et les interactions entre le cofacteur et le substrat montre dans la Figure 14 qu'elle ne joue pas vraiment de rôle non plus dans la stabilisation du cofacteur au sein de l'enzyme.

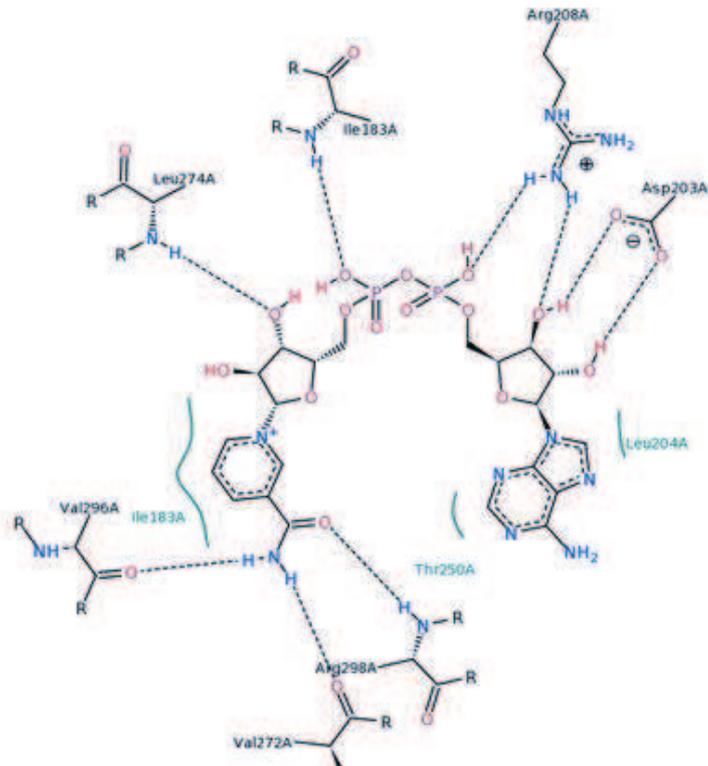


Figure 14 Interaction enzyme-cofacteur pour la SDH humaine

Six acides aminés sont en effet nécessaires pour stabiliser le NAD et les interactions se font *via* les riboses et les phosphates principalement. La partie adénine n'interagit donc peu ou pas, d'où la possibilité de greffer des fonctions supplémentaires quelle que soit leur taille. L'ajout d'un linker sera cependant peut-être nécessaire au vue des surfaces accessibles autour de l'adénine (Figure 15).

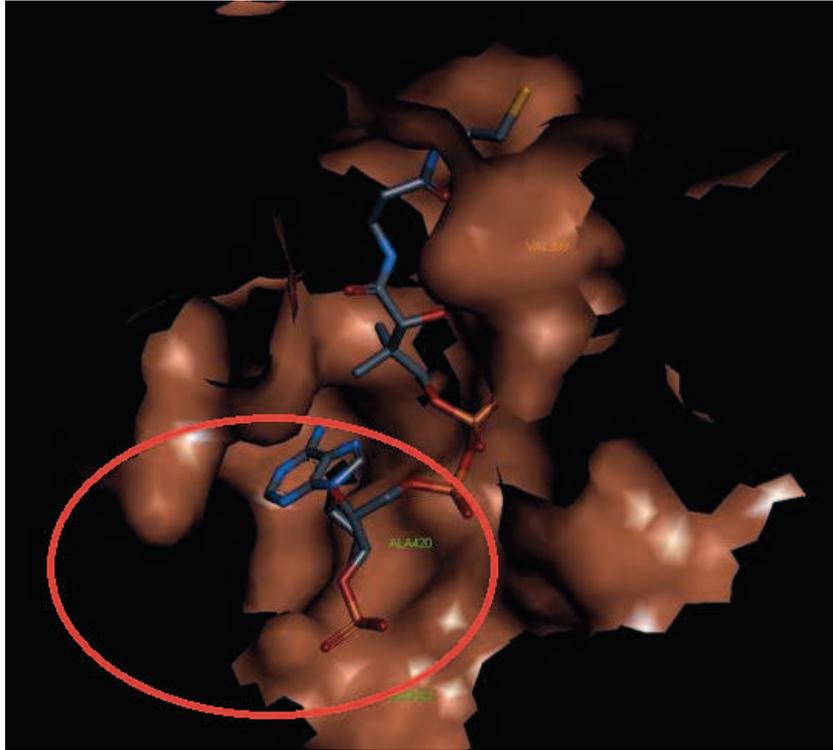


Figure 15 Interactions NAD-enzyme avec la partie adénine-enzyme entourée en rouge pour la SDH humaine

L'adénine entre quand même dans la sorbitol déshydrogénase ce qui est peut-être soit un avantage soit un inconvénient en fonction de la place de l'iridium pour régénérer le cofacteur immédiatement. Le cofacteur « hybride » est donc envisageable sur le papier même si la synthèse et la stabilité d'un tel composé peut sembler complexe.

Conclusion

Lors de l'étude des réactions hybrides nous n'avons pas observé d'inhibition entre les enzymes et les complexes organométalliques de type organo-iridium. Dans un premier temps, nous avons observé un faible rendement en fructose dû à un pH trop basique pour permettre au complexe d'effectuer la régénération du cofacteur de façon catalytique. Cela nous a donc amené à nous interroger sur l'utilisation de la solution tampon dans le milieu, celle-ci captant les protons produits par l'enzyme et ne permettant ainsi pas au complexe d'être régénéré en son espèce active, cette étape nécessitant la consommation d'un proton. L'élimination de la solution tampon nous a permis d'obtenir de meilleurs rendements. Cependant, la cinétique de régénération du complexe étant plus lente que celle de l'enzyme, car la concentration en proton est trop faible pour celui-ci, l'acidification relative de la solution permet à l'enzyme d'effectuer la réaction inverse avec le NADH non transformé. Même l'utilisation du complexe le plus performant mis en évidence dans le chapitre précédent ($\text{Cp}^*\text{Irphen2Cl}$) n'a pas permis une cinétique suffisamment grande pour transformer tout le NADH à un pH permettant à l'enzyme de produire du fructose. Par conséquent, le catalyseur chimique semble bien être le catalyseur cinétiquement limitant pour obtenir une synergie totale entre les deux systèmes.

Lors des tests hybrides réalisés avec la SDH ou la MDH, nous n'avons pas observé de différence flagrante de comportement entre les deux enzymes en conditions hybrides. Ceci nous laisse penser que, quel que soit le mécanisme enzymatique impliqué pour la déshydrogénation de l'hexitol, la présence du complexe organométallique n'entrave pas l'activité de l'enzyme.

Après avoir mis en évidence le problème de compatibilité des deux catalyseurs, nous avons exposé trois perspectives pouvant permettre l'augmentation du rendement en fructose tout en gardant un système hybride de type one-pot one-step. La première perspective concerne le déplacement de la fenêtre d'activité des enzymes. La deuxième perspective est la synthèse et l'évaluation d'un panel de complexe organométallique. Enfin, la troisième perspective est la synthèse d'un cofacteur hybride permettant au complexe organométallique de se trouver plus proche du site actif d'enzyme et donc du proton libéré afin de le capter directement et ainsi limiter les fluctuations de pH néfastes.

Partie expérimentale

Réactions enzymatiques

Les réactions enzymatiques ont été conduites dans des Eppendorf placés dans un multiréacteur Eppendorf Thermomixer C. Le polyol (120 mM) est mis en solution avec le NAD⁺ (2 mM), l'enzyme (50 U.L⁻¹) et le tampon (150 mM) pour ajuster au pH désiré dans un Eppendorf de volume 5 mL. La réaction débute lors de l'ajout de l'enzyme au milieu. Un échantillon de 1 mL est prélevé toutes les 5 minutes puis son absorbance est mesurée par spectroscopie UV-vis à 340 nm. Pour le dosage de NADH, les solutions standards et les références pour le NADH et NAD⁺ sont préparées dans de l'eau milliQ. Le spectromètre Perkin Elmer Lambda 650S UV-vis a été utilisé avec des cuvettes en PMMA de longueur 1 cm (0.5 mL) pour mesurer l'absorbance des standards ou des échantillons qui ont été dilués si besoin. Toutes les analyses ont été effectuées à 25°C. Les calibrations ont été effectuées en mesurant l'absorbance de différentes concentrations de NADH à 340 nm. Elles permettent d'obtenir le coefficient d'extinction molaire du NADH utilisé en utilisant la loi de Beer-Lambert. Ce coefficient est ensuite utilisé pour calculer les concentrations en NADH des échantillons prélevés.

Le pH est mesuré à l'aide d'une électrode pH InLab Micro de Mettler Toledo lorsque la température désirée de la solution est atteinte.

Réactions hybrides

Les réactions hybrides ont été conduites dans des Eppendorf placés dans un multiréacteur Eppendorf Thermomixer C. Le polyol (120 mM) est mis en solution avec le NAD⁺ (20 mM), l'enzyme (50 U.L⁻¹), le complexe organométallique (2 mM). Le pH est ajusté soit à l'aide d'une solution tampon (150 mM) soit avec une solution de soude (10 mM) dans un Eppendorf de volume 5 mL. La réaction débute lors de l'ajout de l'enzyme au milieu. Un échantillon de 1 mL est prélevé puis plongé dans un bain d'azote liquide. La concentration en fructose est par la suite mesurée soit par HPLC soit par HPLIC. La conversion des polyols est déterminée par HPLC. Les échantillons ont été dilués si nécessaire. L'HPLC de marque Shimadzu est équipé d'un détecteur à indice de réfraction (RID). Une colonne Agilent metacarb 87p a été utilisée pour les quantifications du fructose et des polyols. La phase mobile est de l'eau milliQ à un débit de 0,4 mL.min⁻¹, la température de la colonne et du RID sont de 80°C et 35°C, respectivement, pour une détection et une résolution optimale. Pour des faibles concentrations, l'HPLIC Dionex ICS 3000 a été utilisée avec une détection ampérométrique pulsée (PAD). La colonne CarboPac PA1 carbohydate (4x250 mm, de Dionex, Thermofischer Scientific, Inc.), la pré-colonne CarboPac PA1 carbohydate (4x50 mm) et une post-colonne ont été utilisées. La phase mobile étant composée de soude avec 15 mM de NaOH pour la pré-colonne et la colonne, et

300 mM de NaOH pour la post-colonne à un débit de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La température du four est fixée à 30°C .

Le pH est mesuré à l'aide d'une électrode pH InLab Micro de Mettler Toledo lorsque la température désirée de la solution est atteinte.

Conclusion générale

Ce projet de thèse s'inscrit dans le contexte actuel de recherche d'alternatives à la fois de production d'énergie mais également de matériaux à partir de ressources renouvelables. En effet, il se concentre sur la combinaison de réaction enzymatique et chimique pour la transformation de la biomasse. Ainsi, l'objectif ici consistait en le développement et en l'optimisation d'une combinaison d'une enzyme et d'un complexe organométallique pour la production de fructose à partir d'hexitol. Dans cette combinaison, l'enzyme de type alcool déshydrogénase effectue la déshydrogénation sélective de l'hexitol en fructose à l'aide du cofacteur NAD^+ qui est transformé en NADH . Le complexe organométallique, quant à lui, régénère le NAD^+ à partir du NADH . Cette régénération est intéressante car elle permet de déplacer l'équilibre thermodynamique de l'enzyme en supprimant le NADH du milieu mais aussi car le cofacteur peut être introduit en quantité catalytique dans le milieu, ce qui réduit nettement les coûts de la réaction. De plus, ce système de régénération peut s'appliquer à un large nombre d'enzymes utilisant le facteur NAD^+ . Cette combinaison de type one-pot one-step doit être tout à fait simultanée.

Dans un premier temps, l'étude des enzymes de type alcool déshydrogénase nous a permis de sélectionner soigneusement deux enzymes pour réaliser la production de fructose à partir de mannitol et de sorbitol. L'étude de la nature de leur site actif a été menée. Les activités de ces deux enzymes ont été évaluées en fonction des conditions opératoires de pH et de température.

Concernant la réaction de régénération du cofacteur, un complexe organométallique de type cyclopentadiène – iridium - phénantroline a été sélectionné. Ce catalyseur a montré sa capacité à régénérer le NAD^+ dans des conditions qui serait compatibles avec une enzyme mais l'association des deux catalyseurs n'a jamais été rapportée. La formation de NAD^+ à partir de NADH avec le complexe organométallique a été suivi par 1H RMN, nous permettant d'observer qu'en quantité stœchiométrique, le complexe organométallique réalise la réaction quantitativement. Lorsque l'organo-iridium est introduit en quantité catalytique un TON de 1,8 après 90 minutes est obtenu avec un TOF de 8,7. Il a été mis en évidence qu'un manque de proton dans le milieu ralentit l'activité du complexe et stop la réaction. L'étude du mécanisme a été réalisé expérimentalement et grâce à la DFT, permettant ainsi la proposition d'un chemin réactionnel avec de faibles barrières énergétiques.

La faible activité du complexe en condition neutre nous a amené à la modification du ligand phénantroline. Celle-ci ayant pour but d'impacter l'environnement électronique de l'iridium et facilité la protonation de celui-ci, afin de reformer l'espèce active pour la régénération du cofacteur.

L'étude expérimentale a permis de montrer un impact des groupements avec une baisse de l'activité lors de l'ajout de groupement électrodonneur et, inversement, une augmentation de l'activité pour les groupements électroattracteurs. Plus particulièrement le complexe $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{4,7-dichloro-1,10-phénantroline})]^{2+}$ a permis de doubler l'activité avec un TOF de 16 h^{-1} . Une influence des groupements sur la sélectivité des complexes a été révélée. Cela a permis d'expliquer le faible TON pour la phénantroline portant le groupement électroattracteur nitro. L'étude théorique a été réalisée sur les charges portées par les atomes du complexe et par les niveaux d'énergies des orbitales HOMO et LUMO pour les différents complexes. Les résultats ont montré de faibles variations de charges et d'énergies, toujours comprises dans les incertitudes des résultats. Cela est en accord avec la faible variation d'activité observée expérimentalement.

Enfin, la combinaison des deux catalyseurs a été réalisée pour étudier le système hybride. Les tests ont été réalisés dans les conditions opératoires où l'enzyme a une activité de déshydrogénation de l'hexitol en fructose, c'est-à-dire à un pH basique autour de 8,5. Dans ces conditions, le complexe a montré sa capacité à régénérer le cofacteur une seule fois car le milieu est trop déficient en proton pour régénérer l'espèce active du complexe. Ces résultats ont également permis de conclure sur la non-inhibition des catalyseurs entre eux. Le retrait de la solution tampon, ayant la capacité de capter les protons formés par l'enzyme, a pour conséquence l'augmentation de la conversion. Le complexe est capable de se régénérer avec les protons formés et la régénération du cofacteur peut avoir lieu catalytiquement. De même l'ajout du complexe après 20 minutes de réaction, permettant l'acidification du milieu, a permis une conversion en hexitol plus élevée. Le système hybride one-pot one-step incluant le complexe portant les deux atomes de chlore sur la phénantroline montre les meilleures performances jusqu'à présent avec une conversion de 16% après 40 minutes de réaction.

Malgré des efforts de compatibilisation des catalyseurs, les fenêtres de pH des deux systèmes sont différentes et permettent des rendements encourageants bien que faible. De nombreuses perspectives sont envisageables pour faire migrer l'une des fenêtres vers la deuxième. Le travail peut se concentrer tant sur l'enzyme que sur le complexe organométallique. Une perspective concernant le complexe organométallique a été développée dans le Chapitre 5. Cette proposition expose une méthode dans laquelle le complexe d'iridium serait plus proche du site actif de l'enzyme, zone dans laquelle le pH se trouve légèrement plus acide lors de la réaction. Cette perspective est très ambitieuse et nécessite un travail important de synthèse et demande une tolérance de l'enzyme envers une modification du cofacteur.

La combinaison de catalyse chimique et catalyse enzymatique ouvre la voie à de large possibilité pour la valorisation de la biomasse qui sont à étudier.

Annexe 1 – Mécanisme proposé pour la régénération de NAD⁺

