



HAL
open science

Ancrage supramoléculaire de complexes organométalliques dans la bêta-lactoglobuline pour la catalyse asymétrique dans l'eau. Effet des ligands prochiraux hémilabiles.

Lucrèce Pocquet

► **To cite this version:**

Lucrèce Pocquet. Ancrage supramoléculaire de complexes organométalliques dans la bêta-lactoglobuline pour la catalyse asymétrique dans l'eau. Effet des ligands prochiraux hémilabiles.. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066322 . tel-01725138

HAL Id: tel-01725138

<https://theses.hal.science/tel-01725138>

Submitted on 7 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale de Chimie Moléculaire de Paris Centre

Institut Parisien de Chimie Moléculaire / ChemBio

Ancrage supramoléculaire de complexes organométalliques dans la bêta-lactoglobuline pour la catalyse asymétrique dans l'eau. Effet des ligands prochiraux hémilabiles.

Lucrece Pocquet

Thèse de doctorat de Chimie Moléculaire

Dirigée par Michèle Salmain et Serge Thorimbert.

Présentée et soutenue publiquement le 27 octobre 2017

Devant un jury composé de :

M. Arseniyadis Stellios, Directeur de recherche à l'Université Queen Mary de Londres	Rapporteur
M. Mahy Jean - Pierre, Professeur à l'Université Paris-Sud	Rapporteur
M. Perez -Luna Alejandro, Directeur de recherche à l'UPMC	Examineur
M ^m c. Auffrant Audrey, Directrice de recherche à l'Ecole Polytechnique	Examinatrice
M ^m c. Salmain Michèle, Directrice de recherche à l'UPMC	Examinatrice
M. Thorimbert Serge, Professeur à l'UPMC	Examineur

Remerciement

Je souhaite commencer par remercier les membres du jury de thèse. Je remercie donc le Docteur Stellios Arseniyadis et le Professeur Jean–Pierre Mahy pour avoir accepté de juger mon travail ainsi que le Docteur Alejandro Perez-Luna et le Docteur Audrey Auffrant pour avoir accepté de juger ce travail et d’être présents à la soutenance.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse Michèle Salmain et mon co-directeur de thèse Serge Thorimbert pour m’avoir donné l’opportunité de réaliser cette thèse au sein de l’IPCM dans l’équipe ChemBio, et pour m’avoir encadré tout au long de ce travail de recherche. Je les remercie pour la grande aide qu’ils m’ont apportée pendant ces trois ans et notamment lors de l’écriture de cette thèse.

Une partie de ce travail a été effectué en collaboration avec les Docteurs Ilaria Ciofini et Giuseppe Mangiatordi que je souhaite également remercier. Ils ont réalisé l’ensemble des calculs de docking des complexes de palladium et sans qui une grande partie de projet n’aurait pu aboutir. De la même manière, je souhaite remercier le Docteur Sandra Alves, pour sa patience et son aide dans l’utilisation de l’Orbitrap ainsi que les analyses de masse.

Merci également à tous les membres de l’équipe ChemBio, permanents et étudiants, avec qui j’ai pris plaisir à travailler pendant toute la durée de cette thèse et sans qui la vie au laboratoire n’aurait pas été la même. Merci aussi aux autres membres de l’IPCM que j’ai pu côtoyer pendant ces trois années.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes amis pour le soutien qu’ils m’ont apporté tout au long de cette thèse. Sans leur présence, ces trois années auraient été bien différentes.

Enfin, je remercie le LabEx MiChem pour avoir financé ce projet et sans lequel cette thèse n’aurait évidemment pas pu avoir lieu.

Table des matières

Remerciement	3
Table des matières	5
Liste des abréviations	11
Introduction	15
Chapitre 1 : Introduction Bibliographique	19
I. Concept des métalloenzymes artificielles	19
1. Généralités	19
2. Métal de transition	21
3. Protéine hôte	21
4. Approches d'ancrage	23
a. Insertion covalente	24
b. Ancrage par liaison covalente de coordination	26
c. Ancrage Supramoléculaire	28
d. Double ancrage	30
II. Métalloprotéine basée sur la β -lactoglobuline.	31
1. Choix de la protéine hôte	31
a. Structure	32
b. Insertion au sein de la β -Lg	34
c. Métalloprotéine basée sur la β -Lg	36
III. Projet	38
IV. Bibliographie	40
Chapitre 2 : Construction de métalloenzymes artificielles à base de complexes à pince de palladium.	47
I. Complexes à pinces rappel bibliographique	47
1. Structure	47
2. Mode de coordination	49
3. ArMs – Complexe à pince	51
4. ArMs – Pd	53
II. Synthèse de ligands	55
III. Préparation des complexes Pd[XCX]	58
1. Activation de la liaison C-H	58
a. Ligands SCS	58
b. Ligands NCN	61
2. Transmétallation	62
IV. Insertion dans la β -lactoglobuline	66
1. Dichroïsme Circulaire (CD)	66
a. CD dans l'UV-proche	66
b. CD dans l'UV-lointain	71
2. Modélisation	72
V. Synthèse des complexes 7e	77

VI.	Etude d'insertion dans la β -Lg.....	79
1.	Etude par CD	79
2.	Fluorescence	80
VII.	Etudes de stabilité de l'hybride β -Lg \subset Pd.....	86
1.	Ultrafiltration	86
2.	Chromatographie d'exclusion de Taille (SEC).....	87
VIII.	Réactivité des hybrides	89
3.	Réactions de condensation d'aldol.....	90
a.	Rappel bibliographique.....	90
b.	Condensation d'aldol entre le méthylisocynoacétate et le benzaldéhyde dans l'eau.....	93
c.	Suivi de la réaction par RMN à 25°C.....	94
d.	Suivi de la réaction par RMN à 4°C.....	95
e.	Suivi par HPLC.....	99
4.	Condensation d'aldol entre le Tert-butylisocynoacétate et le pivalaldéhyde	101
5.	Etudes du mécanisme.....	108
IX.	Conclusions et perspectives.....	112
X.	Bibliographie	114
	Experimental part.....	119
XI.	Materials	119
XII.	Methods	119
1.	Synthesis of diethyl 5-aminoisophthalate (2).....	119
2.	Synthesis of (5-amino-1,3-phenylene)dimethanol (3)	120
1.	Synthesis of N-(3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl)dodecanamide (4-l)	121
2.	Synthesis of N-(3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl)stearamide (4-s)	121
3.	Synthesis of N-[3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl]hexadecanamide (4-p) ³	122
1.	Synthesis of N-(3,5-bis(bromomethyl)phenyl)dodecanamide (5-l)	122
2.	Synthesis of N-(3,5-bis(bromomethyl)phenyl)stearamide (5-s)	123
3.	Synthesis of N-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]hexadecanamide (5-p).....	123
1.	Synthesis of N-(3,5-bis((dimethylamino)methyl)phenyl)dodecanamide (6-la).....	124
2.	Synthesis of N-(3,5-bis((dimethylamino)methyl)phenyl)stearamide (6-sa)	125
3.	Synthesis of N-{3,5-bis[(dimethylamino)methyl]phenyl}hexadecanamide (6-pa)	125
4.	Synthesis of N-{3,5-bis[(phenylsulfanyl)methyl]phenyl}dodecanamide	126
5.	Synthesis of N-{3,5-bis[(phenylsulfanyl)methyl]phenyl}steramide.....	127
6.	Synthesis of N-{3,5-bis[(phenylsulfanyl)methyl]phenyl}palmamide	127
7.	Synthesis of N-(3,5-bis{[ethanol(methyl)amino]methyl}phenyl)dodecanamide (6-le).....	128
8.	Synthesis of N-(3,5-bis{[ethanol(methyl)amino]methyl}phenyl)stearamide (6-se).....	129
9.	Synthesis of N-(3,5-bis{[ethanol(methyl)amino]methyl}phenyl)hexadecanamide (6-pe)	129
10.	Synthesis of N-(3,5-bis{[ethyl(methyl)amino]methyl}phenyl)hexadecanamide (6-pb).....	130
11.	Synthesis of N-(3,5-bis{[benzyl(ethyl)amino]methyl}phenyl)hexadecanamide (6-pc).....	131
1.	Synthesis of 7-la	131
2.	Synthesis of 7-sa	132
3.	Synthesis of 7-pa.....	133

1.	Synthesis of 7-le	135
2.	Synthesis of 7-se	136
3.	Synthesis of 7-pe.....	136
4.	Synthesis of 7-pb	137
5.	Synthesis of 7-pc.....	138
6.	Synthesis of aqua complexes	139
1.	Synthesis of 7-ld	133
2.	Synthesis of 7-sd.....	134
3.	Synthesis of 7-pd	135
XIII.	Synthesis of authentic aldol condensation products.....	140
1.	<i>Tert</i> -butyl -2-(acetylamino)-3-hydroxy-4,4-dimethylpentanoate.....	140
2.	Methyl-2-(acetylamino)-3-hydroxy-3-phenylpropanoate	140
XIV.	¹ H and ¹³ C NMR spectra of complexes 7-pe	142
XV.	Computational details	144
XVI.	Circular dichroism spectroscopy.....	145
XVII.	HPLC analyses.....	147
1.	Product of aldol condensation between benzaldehyde and methylisocyanoacetate	147
XVIII.	Ultrafiltration	151
XIX.	Size-exclusion chromatography (SEC).....	152
XX.	Fluorescence spectroscopy.....	154
Chapitre 3 : Construction de métalloenzymes artificielles à base de Ruthénium.....		159
I.	Complexes semi sandwich de ruthénium	159
1.	Structure.....	159
2.	Réaction ATH d'arylcétones.....	160
3.	Hémilabilité	161
4.	Catalyse avec des complexes N, S.....	162
5.	ArMs – pour ATH	165
II.	Synthèse des ligands	168
III.	Préparation des complexes.....	170
1.	Série Benzène	170
2.	Changement de ligand arène	171
3.	Changement au niveau du soufre	172
IV.	Insertion dans la protéine	174
1.	Analyse par Dichroïsme circulaire.....	174
2.	Fluorescence	176
V.	Réactivité des complexes.....	180
a.	Mise au point des conditions de réduction	180
b.	Influence de la longueur de chaîne.....	184
c.	Position du substituant sur l'acétophénone	185
d.	Influence du ligand arène et du ligand chélatant	186
e.	Effet de l'oxydation du ligand soufré.....	187
VI.	ATH de la trifluoroacétophénone.	188

VII.	ATH à différents pH	189
VIII.	Mécanisme	190
IX.	Réduction d'imine	192
X.	Conclusion	194
XI.	Bibliographie	196
	Experimental part	200
XII.	Methods	200
1.	Synthesis of tert-butyl (2-((2-aminophenyl)thio)ethyl)carbamate 22	200
2.	Synthesis of tert-butyl (2-((2-stearamidophenyl)thio)ethyl)carbamate 23-s	200
3.	Synthesis of tert-butyl (2-((2-palimidophenyl)thio)ethyl)carbamate 23-p	201
4.	Synthesis of tert-butyl (2-((2-lauridophenyl)thio)ethyl)carbamate 23-l	202
5.	Synthesis of N-(2-((2-aminoethyl)thio)phenyl)stearamide 24-s	202
6.	Synthesis of N-(2-((2-aminoethyl)thio)phenyl)palamide 24-p	203
7.	Synthesis of N-(2-((2-aminoethyl)thio)phenyl)lauramide 24-l	203
8.	Synthesis of N-{2-[(2-aminoethyl)sulfinyl]phenyl}palamide 26-p	204
9.	Synthesis of Ruthenium complex 25-sa	204
10.	Synthesis of Ruthenium complex 25-pa	205
11.	Synthesis of Ruthenium complex 25-la	205
12.	Synthesis of Ruthenium complexes 25-pb	206
13.	Synthesis of Ruthenium complexes 25-lb	207
14.	Synthesis of Ruthenium complexes 25-sc	207
15.	Synthesis of Ruthenium complexes 27-pa	208
XIII.	Circular dichroism spectroscopy	208
XIV.	Fluorescence spectroscopy	209
XV.	ATH of Ketones:	211
1.	<i>Condition GC and retention times</i> :	212
2.	Condition and enantiomeric ratio :	212
XVI.	ATH of imine:	214
a.	Condition GC and retention times :	214
	Chapitre 4: Vers la construction d'une métalloenzyme à base de complexe NHC-Au	217
I.	Complexes NHC	217
1.	Caractéristiques des NHCs libres	218
a.	Propriétés électroniques des NHCs libres	218
b.	Propriétés électroniques des liaisons métal-NHC	219
2.	Complexes NHC-Au	219
a.	Réaction d'hydratation d'allyle	220
b.	Réaction d'hydroamination intramoléculaire	221
c.	Synthèses de furane et d'indole	222
3.	ArMs – NHC	224
a.	Les ions imidazolium	224
b.	Complexes NHC- Métal	226
II.	Projet	231

III.	Synthèse de dérivés Imidazole.....	233
IV.	Préparation des complexes.....	235
V.	Insertion dans la protéine par CD dans le proche uv	236
VI.	Tests catalytiques.....	240
a.	Complexe d'or	240
b.	Imidazolium	241
VII.	Conclusion	243
VIII.	Bibliographie	245
	Experimental part.....	248
IX.	Methods	248
1.	4-nitro-1 <i>H</i> -imidazole 38	248
2.	1-methyl-4-nitro-1 <i>H</i> -imidazole 39.....	248
3.	1-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-4-amine hydrochloride 40 ^c	249
4.	<i>N</i> -(1-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-4-yl)steramide 41-s.....	249
5.	<i>N</i> -(1-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-4-yl)palmitamide 41-p.....	250
6.	<i>N</i> -(1-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-4-yl)dodecanamide 41-l.....	250
7.	1,3-dimethyl-4-(steroylamino)-1 <i>H</i> -imidazol-3-ium iodide 43-s.....	251
8.	1,3-dimethyl-4-(palmytoylamino)-1 <i>H</i> -imidazol-3-ium iodide 43-p.....	251
9.	1,3-dimethyl-4-(dodecanoylamino)-1 <i>H</i> -imidazol-3-ium iodide 43-l.....	252
10.	Complexe 44-s	252
11.	Complexe 44-p.....	253
12.	Complexe 44-l	253
X.	Circular dichroism spectroscopy.....	254
XI.	General procedure for the catalytic reactions between enals and chalcones :.....	254
XII.	General Procedure for the Cyclization :.....	255
	Conclusion	259
	PUBLICATION	261

Liste des abréviations

Ala : Alanine

ArMs : Métalloenzyme artificielle

Asp : Acide aspartique

ATH : Hydrogénation asymétrique par transfert

Benz : Benzène

Biot : Biotine

β -Lg : β -Lactoglobuline

Bn : Benzyle

BOC : *tert*-butoxycarbonyle

Bu : butyle

BSA : sérum-albumine bovine

C : Concentration

CD : dichroïsme circulaire

COSY : Correlation spectroscopy

Cp : Pentaméthylcyclopentadienyl

Cys : Cystéine

DCC : Dicyclohexylcarbodiimide

DCM : Dichlorométhane

DCU : N,N'-dicyclohexylurée

DMF : N,N-Diméthylformamide DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDCI : 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide

ee : Excès énantiomérique

Et : Ethyl

e.r. : Ratio énantiomérique

GC : Chromatographie gazeuse

Gly : Glycine

His : Histidine

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

HRMS : Spectrométrie de Masse Haute Résolution

HSQS : Heteronuclear single quantum coherence

i-Pr : *iso*-propyle

IR : Infrarouge

Kd : constante de dissociation

LC-MS : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

m : Méta

Mes : Mésitylène

MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

MOPS : 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid

NATAL : N-acétyl-L-tryptophanamide

o : Ortho

p : Para

p-cym : p-cymène

Ph : phényle

ppm : Partie par million

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SDS : Dodécylsulfate de sodium

SEC : Chromatographie d'exclusion de taille

T.a : Température ambiante

TFA : Trifluoroacétique acide

TFACP : Trifluoroacétophénone

THF : Tétrahydrofurane

Trp : Tryptophane

UV : Ultraviolet

Val : Valine

INTRODUCTION

Les métalloenzymes artificielles (ArMs) connaissent un réel essor depuis les vingt dernières années avec plus de 530 publications recensées jusqu'à présent (sur web of science avec les mots : artificial metalloenzym*). Le souhait de développer des nouvelles voies de synthèse biocompatibles a fortement stimulé la construction de métalloenzymes artificielles. Ainsi l'utilisation de biomacromolécules hôte permet d'éviter la synthèse de ligands sophistiqués en utilisant la protéine comme source de chiralité, celle-ci fournissant une seconde sphère de coordination bien définie autour du centre métallique, tout en introduisant de nouveaux modes de synthèse de composés chiraux dans des conditions douces. Mon projet de recherche s'est focalisé sur la synthèse des cofacteurs métalliques synthétiques, leur introduction par ancrage supramoléculaire dans une protéine hôte qui sera ici la β -lactoglobuline bovine, la caractérisation des biocatalyseurs hybrides ainsi formés et finalement l'étude de leurs propriétés catalytiques. La stratégie employée est ainsi de combiner les avantages reconnus des biocatalyseurs et des catalyseurs métalliques avec éventuellement des effets synergiques afin de créer un effet global, et permettre la conception de métalloprotéines artificielles innovantes pour la synthèse de différents composés chiraux.

De manière générale, c'est l'architecture protéique qui, pour les ArMs, intervient dans le contrôle et le positionnement du substrat, ainsi que dans la protection du cofacteur vis-à-vis d'éventuelles dégradations. Dans une volonté d'enrichir le transfert de chiralité de ces catalyseurs hybrides vers le produit formé, mais sans pour autant réaliser de modifications par mutation de l'enveloppe protéine, il a été envisagé l'utilisation de ligands prochiraux capables, après complexation avec des métaux, de s'adapter et fournir un hybride unique une fois inséré dans la protéine. Ces complexes possèdent une liaison E-M réversible permettant un équilibre entre les différents stéréoisomères. Cependant une fois insérés dans la protéine, un de ces stéréoisomères peut être favorisé grâce à la seconde sphère de coordination et ainsi déplacer l'équilibre vers la formation d'un hybride unique. Ainsi la sélectivité n'est plus induite uniquement par la seconde sphère de coordination, comme pour les ArMs habituelles, mais par les centres stéréogènes plus proches du métal, ce qui favoriserait ainsi un enrichissement de la chiralité.

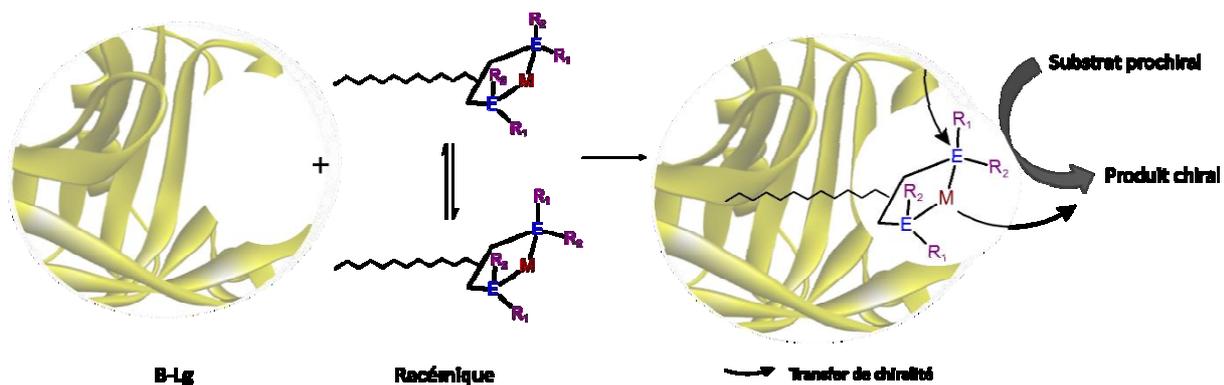


Figure 1 : insertion de complexes présentant un ligand héli-labile dans la protéine.

Cette thèse présentera donc, dans le chapitre introductif, les métalloenzymes artificielles en dévoilant leur conception, leurs atouts et leurs différentes utilisations. Dans les trois chapitres suivants, il sera détaillé la conception de trois nouveaux biocatalyseurs hybrides. Pour cela, la synthèse de trois séries de cofacteurs métalliques à base de palladium, ruthénium et or sera réalisée, suivie de l'étude de leur insertion par ancrage supramoléculaire et du pouvoir catalytique des métalloenzymes artificielles ainsi formées. L'approche proposée s'appuie d'une part sur une expertise dans la synthèse de catalyseurs basés sur des complexes métalliques et d'autre part sur des études de docking qui ont permis la modularité des motifs des complexes pour favoriser l'assemblage des cofacteurs à la protéine hôte et créer de nouvelles opportunités pour la conception de métalloenzymes artificielles plus stables et plus efficaces.

CHAPITRE 1

I. Concept des métalloenzymes artificielles

1. Généralités

Il existe de nombreuses façons d'obtenir des composés énantiomériquement purs et la catalyse asymétrique (homogène et enzymatique) s'est révélée être une méthode efficace. En biocatalyse, la sélectivité est apportée par la « deuxième sphère de coordination », terme utilisé pour définir des combinaisons subtiles d'interactions secondaires (liaison hydrogène, interactions hydrophobes) fournies par la structure de la protéine.¹ Dans la catalyse asymétrique par une espèce métallique, l'activité et la sélectivité sont presque exclusivement dictées par la "première sphère de coordination" fournie par le ligand chiral. Bien que leur mode d'action soit différent, les catalyseurs chimiques et les biocatalyseurs sont complémentaires sur de nombreux aspects: gamme de réactions et de substrats, conditions de fonctionnement ou énantiosélectivité. En outre, les avantages de la catalyse homogène sont souvent des inconvénients dans la catalyse enzymatique². Par exemple, les biocatalyseurs ont une gamme de substrats limitée en raison de la spécificité entre substrat- protéine, et conduisent généralement à un seul énantiomère. Néanmoins, ils ont tendance à être extrêmement sélectifs et effectuent un large éventail de réactions en milieu aqueux. En une seule étape, les biocatalyseurs peuvent effectuer des transformations qui peuvent prendre deux ou plusieurs étapes dans un processus chimique, ils peuvent même effectuer des réactions qui ne peuvent pas être faites par des moyens chimiques. En comparaison, les catalyseurs à base de métaux de transition agissent sur une large gamme de substrats, et les deux énantiomères peuvent être obtenus car les énantiomères du ligand chiral sont souvent plus facilement accessibles. Toutefois, les turnover number (TON) sont généralement plus faibles pour les catalyseurs métalliques que pour les enzymes et les catalyseurs chimiques sont le plus souvent utilisés dans des solvants organiques³. Compte tenu des avantages et inconvénients globaux des deux systèmes, la possibilité de combiner certains aspects de la catalyse bio- et homogène apparaît intéressante.

La fusion de ces deux types de catalyseurs a permis d'aboutir à la création de métalloenzymes artificielles (ArMs). Il s'agit de biocatalyseurs hybrides efficaces dans des conditions douces. Pour se faire elles associent une protéine à un complexe métallique. Ce concept a été rapporté initialement il y a plusieurs décennies par Wilson et Whitesides qui ont introduit la première

métalloenzyme artificielle sans que ce terme soit expressément utilisé⁴. Celle-ci s'appuyait sur l'incorporation non covalente d'un ligand incluant un métal de transition dans une protéine hôte, créant ainsi un nouveau système catalytique supramoléculaire. Plusieurs années plus tard, le développement de ces catalyseurs hybrides combinant les avantages biologiques pour la reconnaissance moléculaire sélective avec ceux de la catalyse a trouvé une renaissance. Des efforts significatifs ont été faits afin de combler le fossé entre la catalyse homogène et la biocatalyse^{1,5}. Ces efforts ont abouti à une stratégie remarquablement polyvalente qui explore et combine les complémentarités relatives de ces deux mondes: l'efficacité, la robustesse et la large gamme des réactions, avec la sélectivité élevée dans les conditions douces des enzymes, le contrôle et le positionnement du substrat, ainsi que dans la protection du cofacteur vis-à-vis d'éventuelles dégradations. Le complexe métallique assure l'activité, dans une enveloppe chirale fournie par la biomolécule hôte. Sont alors créés des centres métalliques avec une seconde sphère de coordination bien définie qui présentent une réactivité et une sélectivité contrôlée.⁶ Une caractéristique intéressante de ces catalyseurs hybrides est que leur performance peut être améliorée par optimisation «chimio-génétique», c'est-à-dire en modifiant indépendamment le catalyseur homogène par optimisation chimique et l'enveloppe biologique par évolution dirigée⁷.

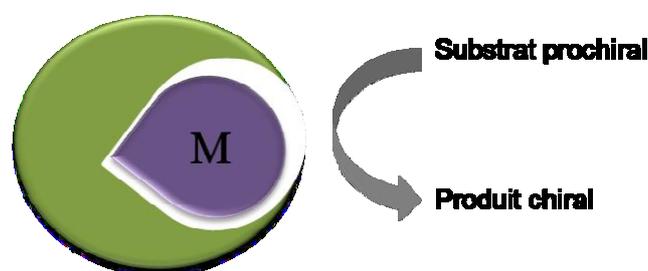


Figure 2 : Metalloenzyme artificielle.

En résumé, dans la catalyse asymétrique à base d'ArMs, la chiralité de la protéine est utilisée pour induire une énantiosélectivité sur le produit formé. Par conséquent, le centre (organo)métallique catalytiquement actif est amené à proximité de la poche de la biomolécule, qui fournit la deuxième sphère de coordination chirale et dirige la réaction catalysée vers un des énantiomères du produit. Ce concept a été démontré avec succès dans un grand nombre de réactions asymétriques classiques, telles que l'hydrolyse de phosphate monoester⁸, l'hydrogénation de cétones⁹, l'hydrogénation par transfert de cétones¹⁰ et d'imines¹¹, l'alkylation allylique¹², la réaction de Friedel-Crafts¹³, la dihydroxylation,¹⁴ la réaction de Diels-Alder¹⁵, la transamination,¹⁶ et la CH-activation¹⁷. Enfin le design de ces

métalloenzymes est basé sur trois paramètres fondamentaux ; le choix du métal de transition, la biomacromolécule hôte et la stratégie d'insertion.

2. Métal de transition

Dans un premier temps il est nécessaire de sélectionner l'espèce métallique qui sera utilisée. En effet, c'est elle qui est responsable de l'activité de la métalloenzyme artificielle. Le choix du métal de transition est principalement déterminé par la réaction considérée. Pour une catalyse asymétrique efficace, le catalyseur doit remplir les conditions suivantes ; être orthogonal à l'échafaudage biomoléculaire¹, donc inerte aux fonctionnalités chimiques présentées par la biomolécule, être compatible avec l'échafaudage biomoléculaire, être tolérant à l'eau, puisque l'utilisation de métalloenzymes artificielles implique d'effectuer la réaction chimique en solution aqueuse. Un autre point à prendre en considération est la compatibilité des conditions réactionnelles (température, pression,...) ou des réactifs (tensioactifs, agents oxydants,...) avec la stabilité de l'échafaudage biomoléculaire. Idéalement, il doit être inactif sous sa forme libre et actif lorsqu'il est incorporé dans l'hôte biomoléculaire.¹ Les conditions de réaction affectent la réactivité des métaux de transition, et par conséquent, celles-ci doivent être sélectionnées et optimisées avec précaution.

3. Protéine hôte

Le paramètre clé dans la conception de la métalloenzyme artificielle est la seconde sphère de coordination fournie par l'échafaudage biomoléculaire, c'est-à-dire la protéine hôte, qui fournit les interactions supramoléculaires et donc permet d'obtenir une sélectivité. Par conséquent, le choix de la structure biomoléculaire et le mode d'ancrage de l'espèce métallique sont de la plus haute importance. Dans de nombreux cas, la structure de la protéine n'apporte pas seulement la sélectivité de la réaction, elle peut aussi affecter la vitesse de réaction de manière positive ou négative. Les métalloenzymes artificielles peuvent être formées à partir de différents types de biomacromolécules ; soit avec des structures possédant déjà un site d'action ou une cavité (comme c'est le cas des protéines), soit avec la création de nouveaux sites actifs (comme avec les acides nucléiques), ce qui permet d'étendre grandement le nombre de structures utilisables. Les exemples de métalloenzymes artificielles décrites dans la littérature jusqu'à présent sont basés sur un nombre limité d'échafaudages protéiques, comme la (strep)avidine, la myoglobine et dans une moindre mesure la papaïne¹⁸. La (strep)avidine et la papaïne présentent une poche pour accueillir le complexe métallique et laisser

suffisamment d'espace pour le substrat. L'utilisation d'un centre métallique existant comme c'est le cas pour la myoglobine qui est une hémoprotéine contenant le groupe prosthétique hème B, représente une approche attrayante car, l'hème peut être remplacée par une autre espèce métallique, et la seconde sphère de coordination peut être en principe génétiquement modifiée pour optimiser les performances du catalyseur.

Les acides nucléiques offrent une alternative intéressante à ces polypeptides comme biomacromolécule hôte pour l'insertion d'espèces métalliques. Un exemple clé de cette stratégie est la conception de métalloenzymes artificielles à base d'ADN. Ces systèmes introduits par Roelfes et Feringa, pour la première fois en 2005, pour les réactions de Diels – Alder,¹⁹ puis plus tard pour la réaction de syn-hydratation de cétones α , β insaturées conduisant à des 1,3-hydroxycétones énantiomériquement enrichies, sont des réactions sans équivalent en catalyse homogène conventionnelle. Pour la syn-hydratation de cétones, Feringa, Roelfes et leurs collaborateurs ont développé un complexe de cuivre, le $[\text{Cu}(\text{diamine})]^{2+}$, utilisé comme acide de Lewis et attaché à un agent d'intercalation. La partie 9-aminoacridine vient alors se lier de manière non covalente à l'ADN double brin (Figure 3). La performance catalytique de cette réaction a été optimisée à la fois par la variation du ligand achiral et de la séquence d'ADN. Le catalyseur le plus sélectif a été obtenu avec les séquences $\text{d}(\text{CAAAAATTTTGG})_2$ et $\text{d}(\text{GCGCTATAGCGC})_2$, et a donné le produit d'hydratation avec jusqu'à 82% d'excès énantiomérique (Figure 3). Cette approche confirme que les acides nucléiques ont la capacité de former des poches catalytiques pour une reconnaissance spécifique des substrats et des cofacteurs. Ils permettent aussi de discriminer les énantiomères et de conduire à la formation de produits avec une énantiosélectivité élevée.²⁰ Le succès du design des métalloenzymes artificielles repose grandement sur le choix de la structure de la biomacromolécule qui ne détermine pas seulement le type de réaction mais aussi le type d'accroche qui va pouvoir être mis en place.

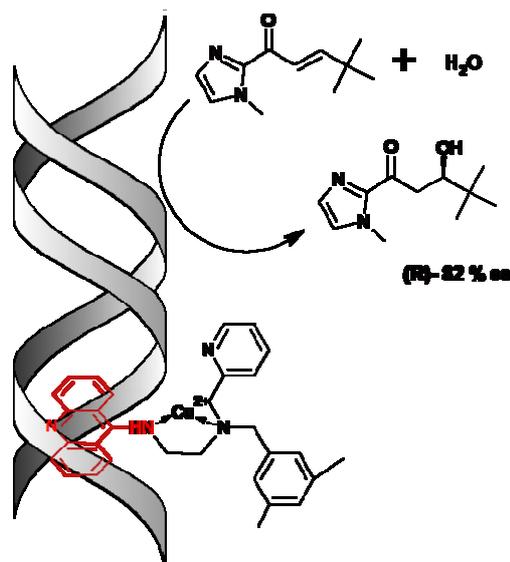


Figure 3 : Syn-hydratation de cétones α,β insaturées.

Par la suite, les oligonucléotides ont permis de réaliser un grand nombre de transformations catalytiques énantiosélectives à partir d'ADN comme biomacromolécule comme des additions Michael et des alkylations de Friedel-Crafts.²¹, et récemment dans l'équipe de Arseniyadis et coll. des réactions d'alkylations de Friedel-Crafts asymétriques ont été réalisées pour la première fois avec un brin d'ARN comme biocatalyseur hybride et ont permis l'obtention d'une énantiosélectivité jusqu'à 54%.²² Ces résultats ont permis démontrer que les brins d'ARN étaient, eux aussi, capables de fournir un contrôle sur l'énantiosélectivité d'une réaction.

4. Approches d'ancrage

Enfin, le dernier point important pour la construction des ArMs est l'approche d'ancrage. Il existe différentes stratégies utilisées pour incorporer un fragment catalytique artificiel dans une biomacromolécule hôte. Trois classes principales se distinguent; l'ancrage covalent, l'ancrage covalent de coordination et une approche non covalente par ancrage supramoléculaire.

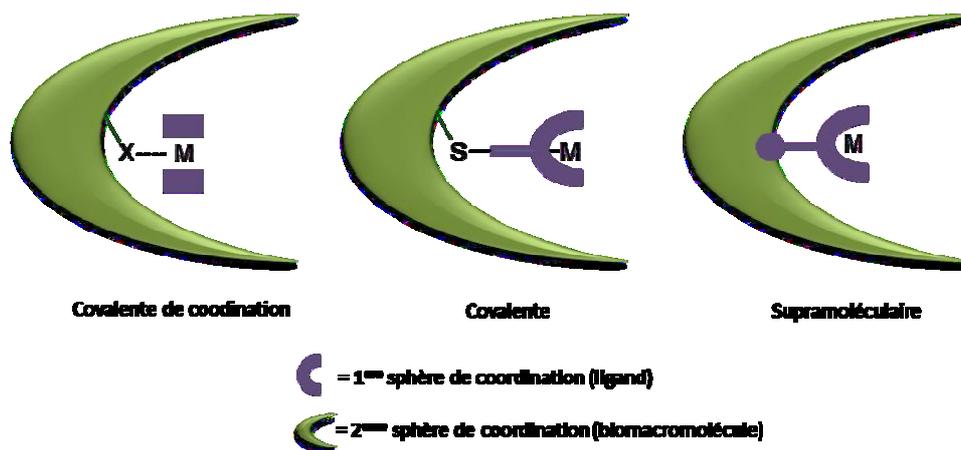


Figure 4 : Les trois principaux modes d'insertion.

a. Insertion covalente

Le premier type d'ancrage consiste en une liaison covalente formée entre le complexe et l'échafaudage biomoléculaire. L'approche d'ancrage covalent est basée sur le travail pionnier de Kaiser (1977).²³ Néanmoins, pour effectuer cette approche il est nécessaire d'avoir un acide aminé avec lequel il est possible d'obtenir une liaison proche du site actif. Le plus souvent, on utilise un résidu cystéine porteur d'une fonction SH, qui permet l'ancrage sélectif du groupement catalytique. Cette approche est souvent privilégiée car elle permet de contrôler l'environnement de la protéine et la géométrie du site catalytique, cependant cette méthode d'ancrage implique des modifications chimiques et des étapes de purification non triviales, qui limitent le nombre de mutants facilement étudiables.

Kaiser et ses collègues ont été les premiers à introduire le concept d'enzyme semi-synthétique résultant de la modification covalente d'un résidu cystéine de la papaïne avec un dérivé isoalloxazine. La stratégie initiale était de combiner la spécificité du substrat de l'enzyme avec la réactivité chimique caractéristique de l'analogue de coenzyme. Par alkylation du site actif cystéine-25 de papaïne avec l'analogue de flavine 7 α -(bromoacétyl)-10-méthylisoalloxazine (Figure 5a)²³ une oxydoréductase semi-synthétique pour l'oxydation de dihydronicotinamides a été synthétisée. La nouvelle enzyme semi-synthétique présentait une cinétique de saturation à de faibles concentrations de substrat et des accélérations de vitesse significatives par rapport au modèle flavine 7-acétyl-10-méthylisoalloxazine.²⁴

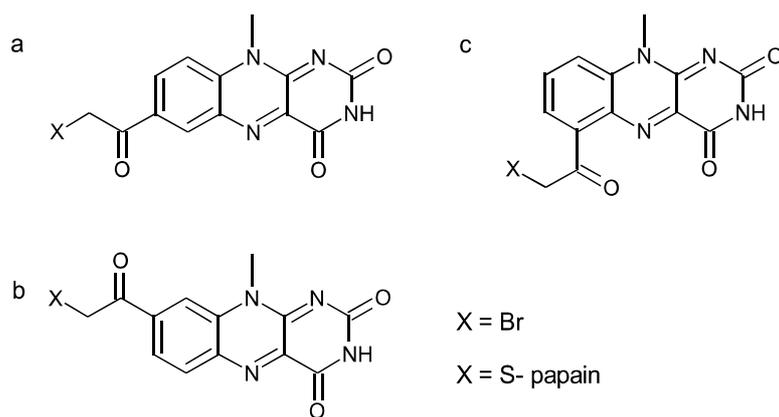


Figure 5 : Différents analogues de la flavine.

Par la suite, deux autres flavopapaines ont été créées par alkylation de la Cys-25 avec les 6 α - et 8 α -(bromoacétyl)-10-méthylisoalloxazine (Figure 5 b, c). Même si les trois isomères (6, 7 et 8-acétyl-10-méthylisoalloxazine) ont une réactivité chimique similaire, les flavopapaines résultantes ont montré des améliorations de vitesse complètement différentes pour la catalyse de l'oxydation des dihydronicotinamides (Figure 5). Alors que la flavopapaine (c) ne présentait aucune amélioration de la vitesse, la flavopapaine (a) augmente d'environ 10 fois la vitesse d'oxydation du groupe prosthétique flavine. Enfin, la flavopapaine (b) montre une réelle augmentation de la vitesse de 100 fois à presque 1000 fois, ce qui est comparable à l'activité présentée par la flavine naturelle des oxydoréductases²⁵ Les trois flavoenzymes ont également été utilisées comme catalyseurs pour l'oxydation de divers dithiols en disulfures, dans des conditions anaérobies. Le catalyseur le plus efficace était de nouveau la flavopapaine (b), avec une augmentation la vitesse de 100 fois par rapport à la flavine modèle.^{24,26,27} Les différences d'efficacité entre les trois flavopapaines sont supposées être le résultat des différences dans la géométrie de la flavine au niveau du site actif. L'orientation de la flavine est déterminée par les interactions hydrogène avec les résidus voisins dans le squelette de la protéine.

De la même manière, au sein du laboratoire, des complexes métalliques ont été synthétisés afin de pouvoir se lier à la Cys-25 de la papaine. Des complexes organométalliques de formule générale $[(\eta^6\text{-arène})\text{Ru}(\text{N}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]^+$ et $[(\eta^5\text{-Cp}^*)\text{Rh}(\text{N}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]^+$ ont été identifiés comme catalyseurs pour la réduction des cofacteurs enzymatiques NAD(P)^+ en NAD(P)H , avec le formiate en tant que donneur d'hydrogène. La comparaison de leur efficacité catalytique vis-à-vis de NAD^+ (exprimée en TOF) a révélé que les complexes de Rh(III) étaient considérablement plus efficaces que les complexes de Ru(II). Dans la série des complexes de

Ru(II), les ligands formant la sphère de coordination autour du métal ont une influence notable sur leur activité. L'ancrage covalent des complexes fonctionnalisés par le maléimide à la papaïne a donné des métalloprotéines hybrides, certaines d'entre elles présentant une activité formiate déshydrogénase.²⁸

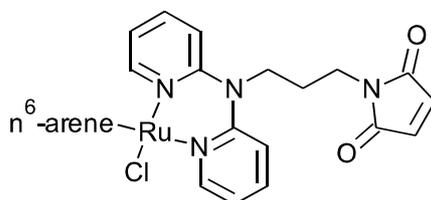


Figure 6 : Complexe semi-sandwich de Ru(II) fonctionnalisé par un maléimide.

b. *Ancrage par liaison covalente de coordination*

Ensuite intervient l'approche covalente de coordination, consistant en une liaison dative entre le métal et un acide aminé de la protéine²⁹ qui agit comme base de Lewis. De telles liaisons de coordination sont créées entre l'ion métallique et les fonctionnalités présentées par l'échafaudage biomoléculaire.

La première métalloenzyme artificielle par ancrage datif a aussi été introduite par Kaiser et ses collègues en 1976. Elle était basée sur le concept de remplacement du métal natif lié au site actif d'une métalloenzyme par un autre, à savoir le Zn^{2+} de la carboxypeptidase A par du Cu^{2+} .³⁰ En appliquant ce concept, les problèmes associés avec la synthèse des ligands et leurs couplages aux protéines sont évités. Cependant, la multiplicité des sites de coordination des métaux aux protéines limite cette approche.²⁶

L'approche de Kaiser a été utilisée par l'équipe de Kazlauskas avec l'anhydrase carbonique (CA) comme hôte protéique, en remplaçant le Zn^{2+} natif du site actif par du Mn^{3+} . L'apo-enzyme (apo-CA) a été préparée avec succès par dialyse avec du 2,6-pyridinecarboxylate. Bien que l'affinité de CA pour le manganèse soit faible, l'activité d'époxydation de Mn-CA était supérieure à celle du manganèse libre, confirmant la formation des époxydes à partir du catalyseur Mn-CA. L'énantiosélectivité dans l'époxydation des styrènes catalysée par Mn-CA était modérée (jusqu'à 67%), mais supérieure à celle des peroxydases naturelles.³²

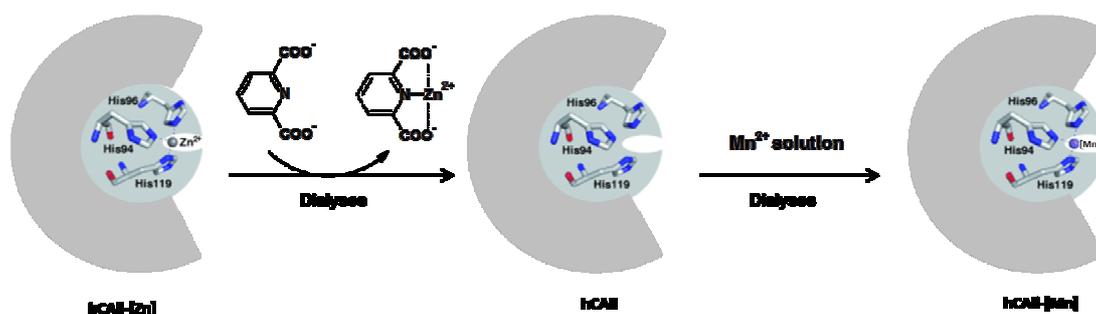


Figure 7 : Remplacement du Zn natif lié au site actif par le Mn.³²

Enfin la myoglobine a été utilisée pour l'insertion par liaison covalente de coordination. Ainsi Watanabe et ses collègues ont décrit une stratégie basée sur la reconstitution de l'apomyoglobine (apo-Mb) et de plusieurs mutants de l'apomyoglobine avec des complexes métalliques contenant des ligands de type base de Schiff (M = Cr et Mn).²⁸

L'apo-Mb est un excellent candidat pour la construction de métalloenzymes artificielles car elle possède une cavité de 10 Å accueillant l'hème. L'hème est lié de manière non covalente à la protéine par l'intermédiaire de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes et également via la coordination de l'histidine His93 avec le fer hémique³⁴ En outre, la reconstitution d'apo-Mb avec l'hème a été bien étudiée.³⁵ Des complexes de base de Schiff ont été utilisés comme catalyseurs pour plusieurs réactions d'oxydation dans des solvants organiques. Sur cette base, les métalloenzymes artificielles résultantes ont été utilisées pour la sulfoxydation énantiosélective du thioanisole avec du peroxyde d'hydrogène. Cependant, la réactivité et l'énantiosélectivité rapportées pour les complexes de base de Schiff insérés dans l'apo-Mb sauvage restent faibles.

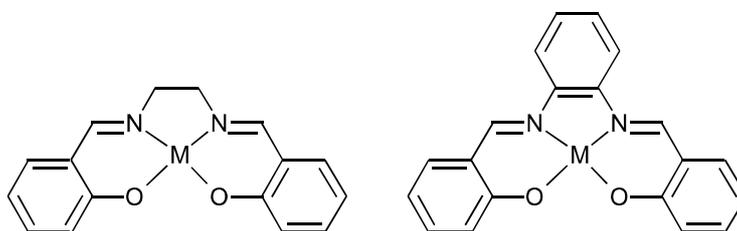


Figure 8 : Complexes de base de Schiff pour l'insertion dans l'apomyoglobine.

De la même manière, l'équipe J.P Mahy a aussi réalisé en 2014, la synthèse et la caractérisation d'un conjugué anionique de fer (III) porphyrine-testostérone. Ce nouveau type de catalyseur a montré une activité catalytique intéressante puisqu'il a été capable de catalyser

la sulfoxydation chimio-sélective et légèrement énantiosélective (ee 13%) du thioanisole par l' H_2O_2 . Ces résultats montrent que de simples modifications au niveau de l'hème de permet d'obtenir une énantiosélectivité modérée.^{36,37}

c. Ancrage Supramoléculaire

L'ancrage supramoléculaire est basé sur des interactions non covalentes fortes et hautement spécifiques entre l'enveloppe biomoléculaire et l'espèce métallique. Soit le fragment catalytique agit comme un ancrage, ou alors il est couplé avec un ligand spécifique possédant une affinité supramoléculaire pour la biomolécule hôte afin de réaliser son ancrage. Pour assurer une localisation adéquate du ligand à l'intérieur de la poche de liaison de la molécule hôte, un couple invité-hôte non covalent très fort doit être choisi. Cette condition vient comme une restriction de la méthode en raison du nombre limité de paires 'hôte – invité' disponibles. Un exemple parfait d'ancrage supramoléculaire est représenté par la technologie biotine-streptavidine.

Un des systèmes les plus efficaces utilisés pour la synthèse de métalloenzymes artificielles basées sur l'ancrage supramoléculaire du catalyseur est représenté par les couples biotine-avidine et biotine-streptavidine. Les deux protéines, l'avidine et la streptavidine, lient la vitamine biotine avec une affinité et une spécificité très élevées. L'affinité de la streptavidine pour la biotine est plus faible ($K_a \approx 2,5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$) que celle de l'avidine ($K_a \approx 1,5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$), mais ce sont les affinités les plus élevées connues dans la nature pour une interaction non covalente.^{38,39} Comme protéine hôte, la streptavidine est un meilleur inducteur chiral que l'avidine,⁴⁰ elle est très stable en présence d'agents dénaturants.⁴¹ Le système biotine-avidine a été utilisé pour la première fois en 1978 par Wilson et Whitesides pour la création de métalloenzymes artificielles. Leur catalyseur hybride, formé par un complexe de rhodium-diphosphane biotinylé achiral assemblé de manière non covalente à l'avidine, a été testé pour l'hydrogénation de l'acide acétamidoacrylique. L'ee de 41% en faveur de la (S)-acétamidoalanine a été induit par la chiralité de la protéine hôte.

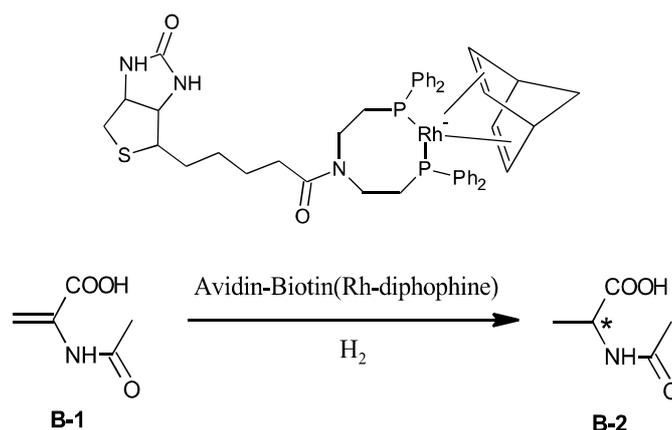


Figure 9 : Hydrogenation de l'acide α -acétamidoacrylique catalysée par la métalloenzyme de Whitesides

L'approche de Wilson et Whitesides a été fortement améliorée par Ward et ses collègues. Ils ont produit plusieurs métalloenzymes artificielles efficaces en utilisant initialement l'avidine et plus tard la streptavidine en tant que protéine hôte, en combinaison avec des catalyseurs biotinylés. A titre de point de départ, le complexe de Whitesides biotin-rhodium-diphosphane ancré dans la streptavidine a été utilisé pour l'hydrogénation de l'acide α -acétamidoacrylique et de l'acide α -acétamidocinnamique. Dix-huit complexes de rhodium-diphosphane biotinylés ont été criblés tout au long de l'étape d'optimisation chimique et 20 mutants de streptavidine ont été testés au cours de l'étape d'optimisation génétique. En conséquence, l'énantiosélectivité a été améliorée à 94% ee pour la (R)- α -acétamidophénylalanine et à 88% ee pour la (S)- α -acétamidophénylalanine.⁴²⁻⁴³ Des améliorations supplémentaires des propriétés de la métalloenzyme artificielle (sélectivité, taux de réaction, tolérance aux solvants) ont été apportées en appliquant de façon approfondie l'approche chimogénétique.⁴⁴ L'optimisation chimique a été réalisée en introduisant des espaceurs d'acides aminés chiraux (proline ou phénylalanine) entre la biotine et le fragment diphosphane et en faisant varier les composants du complexe (métal, ligand diphosphane) et l'espaceur chiral. L'optimisation génétique a été réalisée en introduisant des mutations ponctuelles combinées à une mutagenèse de saturation dans l'échafaudage protéique (figure 12). De cette manière, l'énantiosélectivité a été augmentée à 96% pour la (R)- α -acétamidoalanine et 95% pour la (S)- α -acétamidoalanine.^{40,45} De plus, le catalyseur hybride contenant l'espaceur proline a montré une stabilité améliorée vis-à-vis du DMSO et de l'acétate d'éthyle, ce dernier dans des conditions biphasiques.⁴⁶

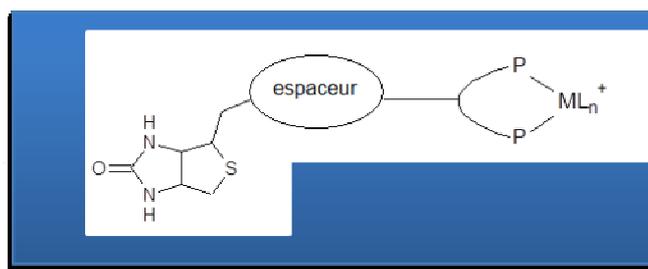


Figure 10 : Association streptavidine-biotine

Reetz a appliqué le concept d'évolution dirigée à une métalloenzyme artificielle,⁴⁷ un processus fondamentalement différent de l'approche utilisée par Ward pour l'optimisation des catalyseurs hybrides à base de biotine-streptavidine pour l'hydrogénation de l'ester méthylique de l'acide α -acétamidoacrylique. En appliquant trois cycles de mutagenèse / expression / criblage aléatoire, en utilisant le système de Whitesides comme point de départ, il a obtenu des hybrides ayant une sélectivité améliorée et / ou inversée. A partir de 23% ee en faveur du produit (R) avant optimisation, l'énantiosélectivité a été augmentée jusqu'à 65%.^{48, 49} Cependant, le concept s'est révélé plus difficile à appliquer pour les catalyseurs hybrides que pour les enzymes naturelles. Ceci est dû principalement aux problèmes associés au système d'expression des protéines et à la sensibilité à l'air des complexes métalliques.

Suite à l'application des métalloenzymes artificielles à base de biotine-streptavidine dans des réactions d'hydrogénation, le groupe de Ward a mis l'accent sur des réactions plus difficiles comme la benzannulation reportée par l'incorporation d'un complexe de rhodium biotinylé combiné à des mutations de la protéine pour permettre un enrichissement énantiomérique⁵⁰ l'alkylation allylique avec des complexes de palladium biotinylé⁵¹ et la sulfoxydation de thioanisole par insertion de salen –manganèse biotinylé.⁵²

d. Double ancrage

Dans certains travaux, les faibles sélectivités observées peuvent généralement être expliquées par le fait que le cofacteur métallique peut adopter différentes conformations dans la protéine. C'est pourquoi une quatrième stratégie, dite de double ancrage, a été développée et peut être obtenue par combinaison de deux méthodes d'ancrage vu précédemment. Ainsi le positionnement de l'espèce métallique et le contrôle stérique de l'entrée du substrat permettra de concevoir de meilleurs catalyseurs hybrides fonctionnels, avec une activité catalytique et une sélectivité pouvant être augmentée. Un exemple de double ancrage a été représenté par Lu *et al.* avec la construction d'une ArM contenant un complexe achiral de Manganèse-Salen

(Mn(Salen)). Pour cela l'Apo-Myoglobine a été choisie comme protéine hôte. Un ancrage covalent du Mn(Salen) à l'Apo-Mb peut être réalisé grâce à la présence de groupements méthane thiosulfonate (Figure 11) connus pour leur bonne sélectivité et réactivité avec les cystéines. Ainsi le cofacteur métallique non natif se retrouve lié à la protéine par deux liaisons covalentes avec 2 cystéines introduites par mutagenèse dirigée et une liaison covalente de coordination entre le Mn (III) et l'His93 (histidine proximale). La comparaison entre la stratégie de double ancrage et la stratégie précédente rapportant un ancrage par une unique liaison covalente de coordination du catalyseur, a mis en évidence l'avantage de cette nouvelle approche. Dans des travaux précédents, l'association de complexes Mn(Salen) à l'Apo-Mb par la seule présence de liaison covalente de coordination avait donné, dans le cas de la sulfoxydation du thioanisole, une faible vitesse de réaction et des ee très bas (0-3%). Lorsqu'un seul point d'accroche supplémentaire est ajouté une augmentation de la vitesse de réaction de 0.051 min^{-1} et de l'ee (12%) est observée. Enfin dans le cas du double ancrage une augmentation significative de la vitesse (0.390 min^{-1}) et de l'ee (51%) est constatée. Ces résultats montrent bien que le double ancrage permet de restreindre de manière efficace le nombre de conformations possibles du complexe dans la protéine et ainsi accéder à de bonnes vitesses de réaction et un bon ee.⁵³

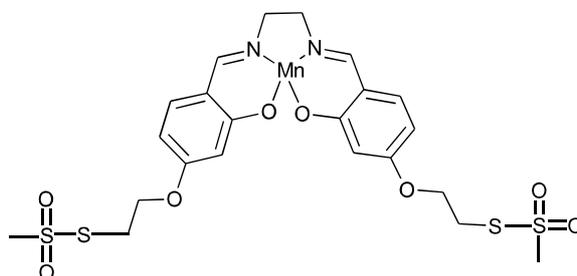


Figure 11 : Complexe Mn-salen pour le double ancrage covalent à l'apo-myoglobine

II. Métalloprotéine basée sur la β -lactoglobuline.

1. Choix de la protéine hôte

Les protéines du lait bovin sont divisées en deux fractions, la caséine et les protéines du lactosérum, qui représentent respectivement environ 80 et 20% des protéines totales du lait. Les principales protéines de lactosérum sont la β -lactoglobuline (β -Lg), l' α -lactalbumine (α -la) et la sérum-albumine bovine (BSA). La β -Lg, est la protéine principale du lactosérum (concentration 3,2 g/L). Cette protéine a été étudiée de façon intense et est connue pour lier

avec une forte affinité de l'ordre du μM des ligands hydrophobes tels que les acides gras ou des vitamines liposolubles. Néanmoins, au-delà de la contribution nutritionnelle des composants individuels (β -Lg et ligands), les fonctions biologiques de la protéine sont encore spéculatives. L'affinité que possède la β -Lg pour ces différents ligands fait de cette protéine un candidat possible pour la formation de métalloprotéines artificielles par ancrage supramoléculaire.

a. Structure

La structure tertiaire (le repliement) fournit la seconde sphère de coordination autour du métal. Il existe différents variants génétiques de la β -Lg, les deux plus connus étant les variants A et B⁵⁴, qui ne diffèrent que par deux acides aminés en position Asp64 pour A (Gly64 pour B) et Val118 (Ala 118 pour B). Les deux variants sont composés de 162 acides aminés répartis en deux hélices alpha et en 8 feuillets β antiparallèles. Ils contiennent cinq cystéines (Cys) localisées en position 66, 106, 119, 121, et 160.⁵⁵ Quatre d'entre-elles établissent des ponts disulfures mais la Cys121 présente un thiol libre qui est niché au centre de la structure de la β -Lg et participe à la stabilité de la protéine native. Cependant, le groupe thiol libre est inaccessible aux solvants dans la structure protéique native et, par conséquent, n'est pas disponible pour des réactions dans des conditions physiologiques. En solution aqueuse et à pH neutre, les feuillets β antiparallèles forment une cavité cylindrique, appelé calice. Cette cavité a ses feuillets β reliés par le feuillet A sur un côté, tandis qu'une liaison secondaire est formée entre les feuillets D et E. L'hélice α est piégée entre les feuillets A et H et est suivie du neuvième feuillet β appelé I. Dans la protéine native, des ponts disulfures relient les feuillets G à H (Cys106-Cys119) et le feuillet D au C terminal (Cys66-Cys160). Le calice est fermé à une extrémité par la boucle N-terminale et peut être fermé à l'autre par la boucle EF dans des conditions de faible pH (Figure 12). En milieu neutre, les deux variants A et B possèdent la même structure tertiaire. En condition physiologique, la β -Lg est en équilibre entre la forme monomère et la forme dimère non covalent. Cet équilibre (entre la proportion forme dimère et monomère) varie en fonction de la concentration de la protéine, le pH et la température.⁵⁶

Par la suite de nombreux travaux ont été réalisés afin de déterminer la stabilité de la β -Lg vis-à-vis de la température ainsi que du pH. Sa dénaturation thermique se produisant entre 50 et 75° C se traduit par un changement de conformation et le démasquage du groupe SH de la Cys121.^{57,58} La dénaturation est réversible pour une température inférieure à 65-70°C.

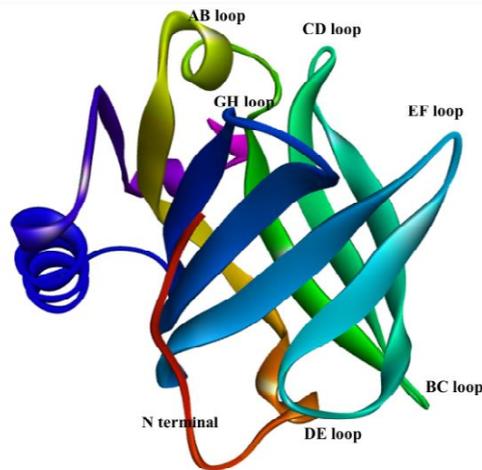


Figure 12 : Structure de la β -Lg

La β -Lg subit de nombreux changements en fonction du pH, mais le plus significatif est la transition de Tanford. Cette transition est déclenchée pour un pH supérieur à 6,5, et est provoquée par la protonation du Glu89 qui possède un pK_a anormalement haut.⁵⁹ Cette transition de Tanford implique le déplacement de la boucle EF (résidus 85 à 90), ce qui conduit à la fermeture ou à l'ouverture de l'accès à la cavité hydrophobe de la protéine. En effet, pour un pH inférieur à 6,5, l'accès à la cavité est fermé et s'ouvre à un pH plus élevé. La transition de Tanford peut également impliquer d'autres changements structuraux. Par exemple, la transition est accompagnée d'un changement dans le microenvironnement de la Tyr42 et provoque une altération de l'orientation relative des monomères dans le dimère jusqu'à 5°.⁶⁰ Il convient de noter que toutes les transitions qui se déroulent entre pH 2 et pH 9 ne provoquent pas de changements appréciables dans la conformation de la β -lactoglobuline. En revanche, au-dessus du pH 9, la β -Lg subit un changement de conformation irréversible, une transition de déroulement induite par la base avec perturbation globale des structures secondaires et tertiaires.⁶¹

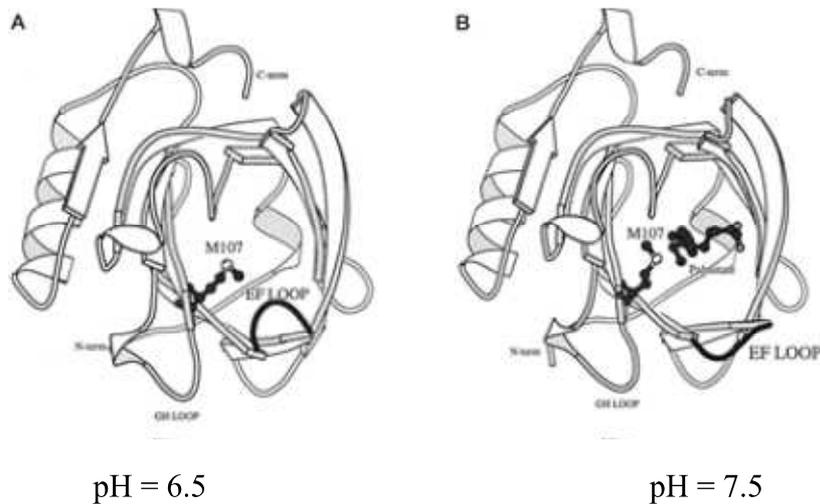


Figure 13 : Fermeture et ouverture de la boucle EF en fonction du pH (Transition de Tanford)

b. Insertion au sein de la β-Lg

La β-Lg appartient à la famille des lipocalines, un groupe de protéines impliquées dans la reconnaissance et le transport de petites molécules hydrophobes, qui sont constituées de huit feuilletts β antiparallèles (A à H) formant un site de liaison du ligand.⁶² En 1949, McMeekin et al. ont décrit la liaison du dodécylsulfate de sodium (SDS) à la β-Lg native.⁶³ Depuis lors, il a été démontré que la β-Lg native lie de nombreux ligands hydrophobes tels que le rétinol, la vitamine D, le cholestérol, la curcumine, les acides gras et leurs dérivés. La β-Lg possède un site de liaison bien défini par monomère et, selon les ligands et les conditions du milieu, un ou plusieurs sites de liaison secondaires ont été rapportés. Des études cristallographiques ont clairement montré l’insertion du palmitate dans la cavité de la β-Lg. Plusieurs structures de la protéine seule et complexée avec l’acide palmitique ont été résolues par RMN ou par des méthodes cristallographiques à rayons X, ce qui révèle que la β-Lg forme un complexe avec une stœchiométrie 1: 1.⁶⁴ Pour tous les complexes 1: 1, le ligand est placé dans une configuration dans laquelle la ‘queue’ aliphatique est insérée dans la cavité hydrophobe, tandis que la fonction carboxylate interagit avec les acides aminés voisins Glu62 et Lys69 situés à l’entrée de la poche.⁵⁶ Des études de dynamique structurale ont démontré qu’une réduction conformationnelle se produit lors de la formation de complexes avec la β-Lg, tandis que des études de diffusion de ligand ont montré que les résidus dans les boucles EF (résidus A86 et L87) et AB (P38 et L39), feuillet D (I71), Lys60 et Lys69 aident à ajuster le ligand dans la cavité protéique. Plusieurs études ont également indiqué un site de liaison secondaire sur le monomère protéique. La β-Lg peut simultanément lier deux ligands différents à deux

sites différents comme montré pour le rétinol et la protoporphyrine ainsi que pour un mélange d'acide palmitique et de rétinol. Cependant, Puyol et al. ont trouvé que l'acide palmitique et le rétinol avaient le même site de liaison. Afin d'identifier la liaison compétitive de deux ligands, ces études ont déterminé la différence de constantes de liaison en présence d'un ou deux ligands. Cependant, ces deux groupes de recherche n'ont pas utilisé les mêmes méthodes (ultrafiltration *versus* fluorescence), ce qui pourrait expliquer l'écart des résultats observés sur la liaison concomitante de l'acide palmitique et du rétinol. Des études ultérieures ont confirmé la présence de deux sites de liaison distincts. Le second site de liaison sur la β -Lg est supposé être situé dans la poche hydrophobe formée par l'hélice α et le brin β . Ceci a été confirmé expérimentalement sur la structure cristalline du complexe β -Lg / vitamine D. Un autre site de liaison possible a été suggéré et serait situé à l'interface du dimère. ⁶⁶

En utilisant une méthodologie basée sur l'ultrafiltration, il a été montré que l'insertion pouvait dépendre de la concentration en protéine. C'est notamment le cas avec la liaison du palmitate à la β -Lg. Une augmentation de la concentration en protéine de 1 à 200 μ M, qui augmente la fraction de dimères en solution, conduit à la formation d'une poche hydrophobe pour la liaison du palmitate. L'effet du pH et de la force ionique sur le nombre de sites de liaison a également été illustré dans le cas de la liaison de la vitamine D3 à la β -Lg. Dans des conditions de pH faibles, lorsque la boucle EF est fermée, la liaison peut se produire seulement à un site de liaison externe. En faisant varier le pH et la force ionique, ces auteurs ont montré que la vitamine D3 se lie à la protéine dans le calice et à la surface de la protéine. Ce dernier site de liaison présentait une affinité plus faible lorsque la protéine était monomère, alors que l'affinité augmentait de manière significative lorsque le β -Lg était dimère.

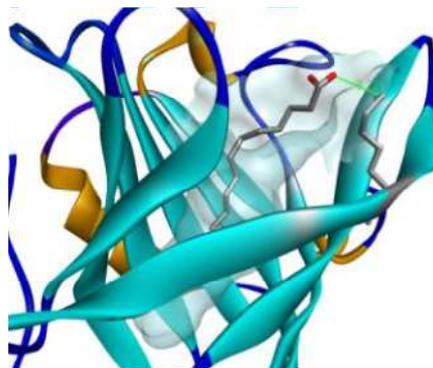


Figure 14 : Insertion de l'acide palmitique dans le calice de la β -Lg

L'association entre la β -Lg et les acides gras a été caractérisée par titrage calorimétrique isotherme (ITC), fluorescence et spectrométrie de masse. Ces différentes techniques ont permis de fournir les valeurs de stœchiométrie (mol ligand/ mol protéine ; n) et de constante de dissociation (K_d). Les interactions des acides gras avec les β -Lg porcine et bovine ont été mesurées en utilisant un suivi de la fluorescence du tryptophane. Dans le cas de la β -Lg bovine, les constantes de liaison pour la plupart des acides gras saturés et insaturés se situaient aux alentours de 10^{-7} M^{-1} à $\text{pH} = 7.5$. La β -Lg présente une haute affinité pour l'acide palmitique avec une constante de dissociation apparente de $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (pour $n = 0.9$). La force de la liaison décroît de la manière suivante: palmitate (C16) > stéarate (C18) > myristate (C14) > arachidonate (C20) > laurate (C12).⁶⁷ L'affinité de la β -Lg pour le palmitate diminue lorsque le pH du milieu d'incubation est abaissé et disparaît totalement en dessous du $\text{pH} = 4.5$. L'interaction supramoléculaire entre la protéine et les acides gras laisse supposer qu'en venant fonctionnaliser ces acides gras avec des complexes métalliques, il serait possible de réaliser l'insertion d'espèces métalliques au sein de la β -Lg.

c. Métalloprotéine basée sur la β -Lg.

En se basant sur l'affinité des acides gras avec la β -Lg, la formation de métalloenzymes artificielles a été démontrée en 2012 au laboratoire en combinant la β -lactoglobuline et des complexes semi-sandwich de Ru(II) et de Rh(III) comprenant des ligands de type dipyridine.⁶⁸ En effet, pour générer ces métalloenzymes, des dérivés d'acides gras comprenant une entité dipyridylamine (DPA) ou bispyridylméthane (BPM) comme fragment chélatant ont été synthétisés. Ces nouveaux complexes ont permis de catalyser la réaction d'hydrogénation par transfert d'une cétone aromatique activée, à savoir le 2,2,2-trifluoracétophénone (TFACP), dans l'eau à pH neutre et à température douce en présence de formiate comme donneur d'hydrogène. De bonnes conversions en alcool correspondant ont été atteintes dans les 72 heures avec les complexes de rhodium(III) et les meilleurs énantiosélectivités ont été mesurées avec les complexes de Rhodium dérivés des acides palmitique et stéarique, une fois incorporés dans la β -Lg (jusqu'à 32% ee pour l'énantiomère (R)).

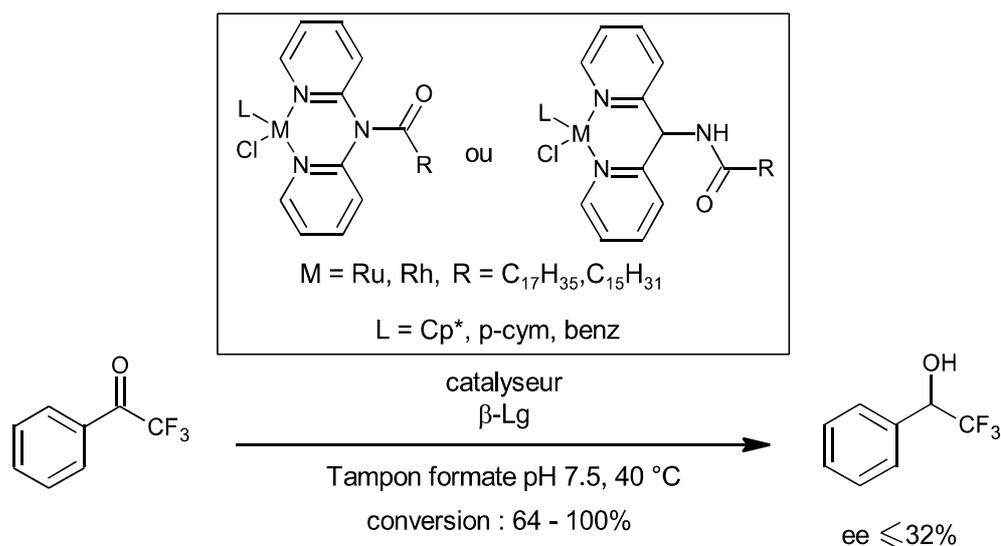


Figure 15 : Réaction d'hydrogénation par transfert asymétrique sur la trifluoroacétophénone.

De plus, le complexe de rhodium fonctionnalisé avec une chaîne palmitique présente une constante de dissociation calculée ($2,8 \times 10^{-7} \text{ M}$) qui avoisine celle de l'acide palmitique seul, montrant ainsi que la tête métallique n'affecte pas vraiment l'insertion du complexe dans la protéine.⁶⁹

Une autre approche cette fois covalente a été développée dans l'équipe de J.P Mahy afin de créer une mono-oxygénase artificielle à partir de la $\beta\text{-Lg}$.⁷⁰ Pour cela, la Cys121 est ciblée afin d'introduire de manière covalente un complexe ferrique fonctionnalisé par un groupement maléimide. Cette Cys121 se trouvant dans une petite cavité hydrophobe entre un feuillet β et l'hélice α permet l'insertion du complexe de fer comme mentionné ci-dessus.

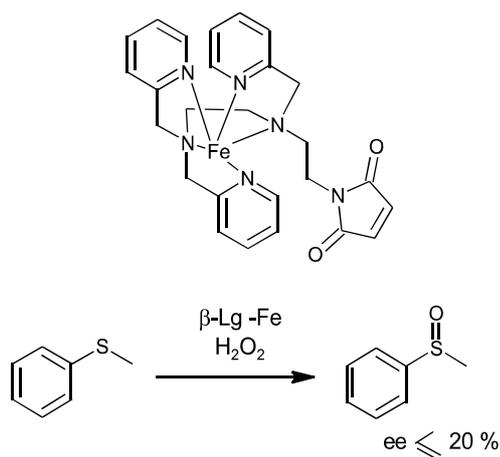


Figure 16 : Sulfoxydation du thioanisole.

La réactivité de cet hybride Fe- β -Lg a été démontrée par la suite avec la sulfoxydation énantiosélective du thioanisole par le peroxyde d'hydrogène avec un excès énantiomérique de 20%

III. Projet

La construction de métalloprotéines artificielles tente de tirer profit des propriétés attrayantes à la fois de la catalyse homogène et de la biocatalyse, par exemple pour effectuer des procédés catalytiques importants tels que des hydrogénations par transfert. Cependant, deux des principaux défis dans ce domaine sont : le développement d'enzymes artificielles pour de nouvelles réactions et une meilleure compréhension des mécanismes. Cette thèse contribue à résoudre ces défis en mettant en place des outils synthétiques et des méthodologies pour développer la technologie de la β -Lg pour de nouvelles applications.

Dans la première partie de la thèse, l'objectif est de concevoir une métalloprotéine artificielle basée sur l'incorporation supramoléculaire de catalyseurs organométalliques dans la β -Lg en utilisant la technologie β -Lg \subset Acide gras. Différentes espèces métalliques à base de palladium, ruthénium et or seront mises en jeu, dans le but cette fois de pouvoir faire varier les réactions catalytiques éventuelles. Afin de déterminer un environnement chiral favorable dans la protéine, différentes longueurs de chaînes seront introduites, l'objectif étant de faire varier la position du complexe organométallique dans la protéine.

Un premier défi sera de synthétiser des complexes de palladium à base de ligands à pinces fonctionnalisés, pour catalyser des réactions de condensation d'aldol, ainsi que des complexes

de ruthénium pour la catalyse énantiosélectives de réactions de transfert hydrogénant de cétones.

Un deuxième défi sera l'utilisation de complexes à ligands hémilabiles. Ces complexes possèdent une liaison E-M réversible permettant un équilibre entre les différents stéréoisomères. Cependant une fois insérée dans la protéine un de ces stéréoisomères peut être favorisé et ainsi déplacer l'équilibre vers la formation d'un hybride unique. Cela permettrait de ne plus avoir seulement une sélectivité induite par la seconde sphère de coordination, comme pour les ArMs habituelles, mais de générer des centres stéréogènes plus proches du métal, ce qui favoriserait ainsi un enrichissement de la chiralité. L'atout de ce projet est de favoriser le transfert de chiralité de la seconde sphère de coordination de la protéine vers les substituants du complexe, favorisant ainsi l'induction asymétrique pour le produit de la réaction.

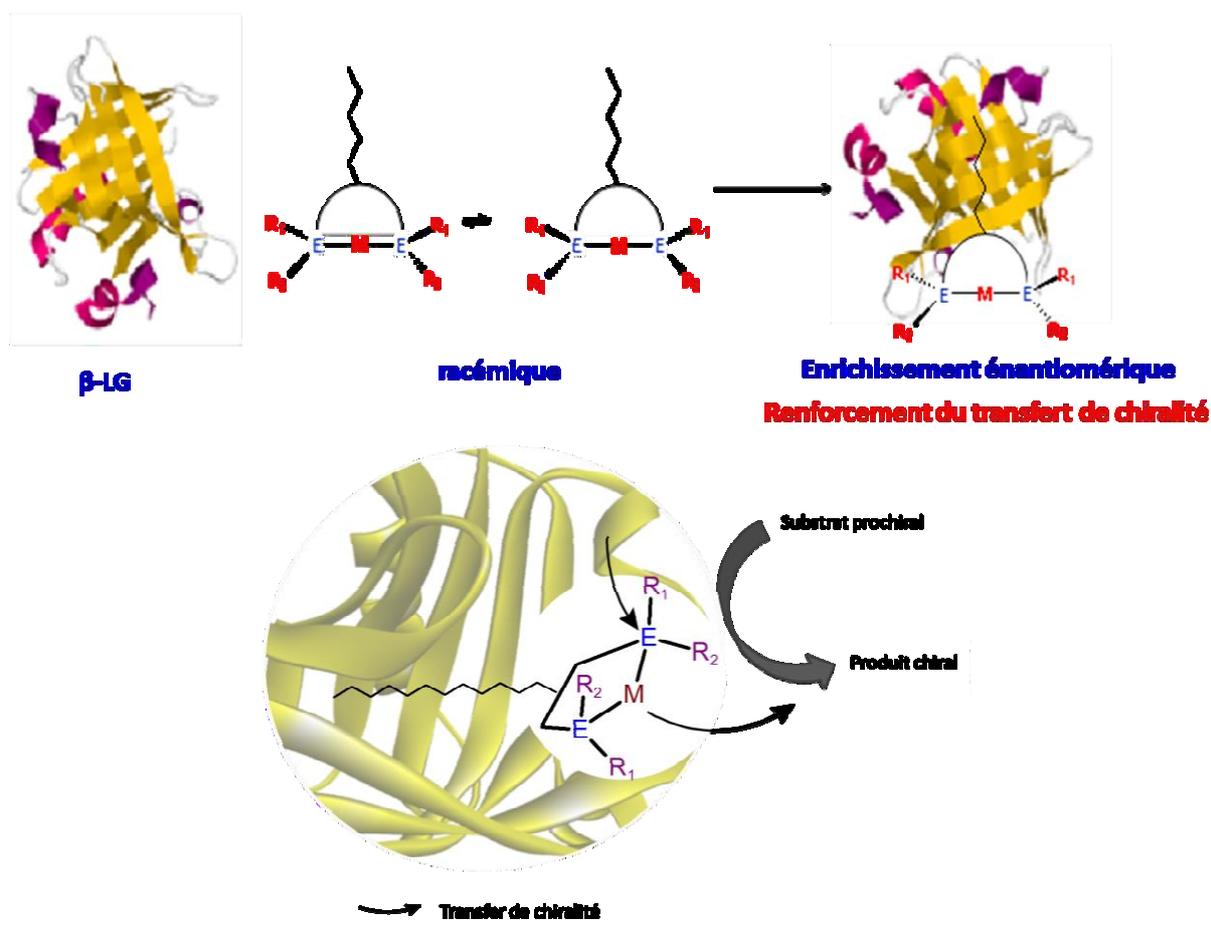


Figure 17 : insertion de complexes présentant un ligand héli-labile dans la protéine.

IV. Bibliographie

- (1) Rosati, F.; Roelfes, G. Artificial Metalloenzymes. *ChemCatChem* **2010**, *2* (8), 916–927.
- (2) Ke, Z.; Abe, S.; Ueno, T.; Morokuma, K. Catalytic Mechanism in Artificial Metalloenzyme: QM/MM Study of Phenylacetylene Polymerization by Rhodium Complex Encapsulated in Apo-Ferritin. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (37), 15418–15429.
- (3) Meeuwissen, J.; Reek, J. N. H. Supramolecular Catalysis beyond Enzyme Mimics. *Nat. Chem.* **2010**, *2* (8), 615–621.
- (4) Heinisch, T.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes Based on the Biotin-Streptavidin Technology: Challenges and Opportunities. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49* (9), 1711–1721.
- (5) Deuss, P. J.; den Heeten, R.; Laan, W.; Kamer, P. C. J. Bioinspired Catalyst Design and Artificial Metalloenzymes. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (17), 4680–4698.
- (6) Ringenberg, M. R.; Ward, T. R. Merging the Best of Two Worlds: Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Catalysis. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (30), 8470.
- (7) Häring, D.; Distefano, M. D. Enzymes by Design: Chemogenetic Assembly of Transamination Active Sites Containing Lysine Residues for Covalent Catalysis. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12* (3), 385–390.
- (8) Zulkefeli, M.; Suzuki, A.; Shiro, M.; Hisamatsu, Y.; Kimura, E.; Aoki, S. Selective Hydrolysis of Phosphate Monoester by a Supramolecular Phosphatase Formed by the Self-Assembly of a Bis(Zn²⁺-Cyclen) Complex, Cyanuric Acid, and Copper in an Aqueous Solution (Cyclen = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane). *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (20), 10113–10123.
- (9) Basauri-Molina, M.; F. Riemersma, C.; A. Würdemann, M.; Kleijn, H.; Gebbink, R. J. M. K. Lipase Active Site Covalent Anchoring of Rh(NHC) Catalysts: Towards Chemoselective Artificial Metalloenzymes. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (31), 6792–6795.
- (10) Letondor, C.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Catalysis: Recent Advances. *ChemBioChem* **2006**, *7* (12), 1845–1852.
- (11) Zimbron, J. M.; Heinisch, T.; Schmid, M.; Hamels, D.; Nogueira, E. S.; Schirmer, T.; Ward, T. R. A Dual Anchoring Strategy for the Localization and Activation of Artificial Metalloenzymes Based on the Biotin–Streptavidin Technology. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (14), 5384–5388.
- (12) Bos, J.; Browne, W. R.; Driessen, A. J. M.; Roelfes, G. Supramolecular Assembly of Artificial Metalloenzymes Based on the Dimeric Protein LmrR as Promiscuous Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (31), 9796–9799.
- (13) Amirbekyan, K.; Duchemin, N.; Benedetti, E.; Joseph, R.; Colon, A.; Markarian, S. A.; Bethge, L.; Vonhoff, S.; Klussmann, S.; Cossy, J.; Vasseur, J.-J.; Arseniyadis, S.; Smietana, M. Design, Synthesis, and Binding Affinity Evaluation of Hoechst 33258 Derivatives for the Development of Sequence-Specific DNA-Based Asymmetric Catalysts. *ACS Catal.* **2016**, *6* (5), 3096–3105.
- (14) Köhler, V.; Mao, J.; Heinisch, T.; Pordea, A.; Sardo, A.; Wilson, Y. M.; Knörr, L.; Creus, M.; Prost, J.-C.; Schirmer, T.; Ward, T. R. OsO₄-Streptavidin: A Tunable Hybrid Catalyst for the Enantioselective Cis-Dihydroxylation of Olefins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (46), 10863–10866.
- (15) Ghattas, W.; Cotchico-Alonso, L.; Maréchal, J.-D.; Urvoas, A.; Rousseau, M.; Mahy, J.-P.; Ricoux, R. Artificial Metalloenzymes with the Neocarzinostatin Scaffold: Toward a Biocatalyst for the Diels–Alder Reaction. *ChemBioChem* **2016**, *17* (5), 433–440.

- (16) Dong, Z.; Yongguo Wang; Yin, Y.; Liu, J. Supramolecular Enzyme Mimics by Self-Assembly. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2011**, *16* (6), 451–458.
- (17) Upp, D. M.; Lewis, J. C. Selective C–H Bond Functionalization Using Repurposed or Artificial Metalloenzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *37*, 48–55.
- (18) Talbi, B.; Haquette, P.; Martel, A.; Montigny, F. de; Fosse, C.; Cordier, S.; Roisnel, T.; Jaouen, G.; Salmain, M. (η^6 -Arene) Ruthenium(ii) Complexes and Metallo-Papain Hybrid as Lewis Acid Catalysts of Diels–Alder Reaction in Water. *Dalton Trans.* **2010**, *39* (24), 5605–5607.
- (19) Roelfes, G.; Feringa, B. L. DNA-Based Asymmetric Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (21), 3230–3232.
- (20) Boersma, A. J.; Coquière, D.; Geerdink, D.; Rosati, F.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. Catalytic Enantioselective Syn Hydration of Enones in Water Using a DNA-Based Catalyst. *Nat. Chem.* **2010**, *2* (11), 991–995.
- (21) Duchemin, N.; Heath-Apostolopoulos, I.; Smietana, M.; Arseniyadis, S. A Decade of DNA-Hybrid Catalysis: From Innovation to Comprehension. *Org. Biomol. Chem.* **2017**.
- (22) Duchemin, N.; Benedetti, E.; Bethge, L.; Vonhoff, S.; Klussmann, S.; Vasseur, J.-J.; Cossy, J.; Smietana, M.; Arseniyadis, S. Expanding Biohybrid-Mediated Asymmetric Catalysis into the Realm of RNA. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (55), 8604–8607.
- (23) Levine, H. L.; Nakagawa, Y.; Kaiser, E. T. Flavopapain: Synthesis and Properties of Semi-Synthetic Enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *76* (1), 64–70.
- (24) Levine, H. L.; Kaiser, E. T. Oxidation of Dihyronicotinamides by Flavopapain. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100* (24), 7670–7677.
- (25) Slama, J. T.; Radziejewski, C.; Oruganti, S.; Kaiser, E. T. Semisynthetic Enzymes: Characterization of Isomeric Flavopapains with Widely Different Catalytic Efficiencies. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (22), 6778–6785.
- (26) Fried, H. E.; Kaiser, E. T. Oxidation of Dithiols by Flavopapain. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (1), 182–184.
- (27) Stewart, K. D.; Radziejewski, C.; Kaiser, E. T. The Catalytic Oxidation of Dithiols by a Semisynthetic Enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (12), 3480–3483.
- (28) Haquette, P.; Talbi, B.; Barilleau, L.; Madern, N.; Fosse, C.; Salmain, M. Chemically Engineered Papain as Artificial Formate Dehydrogenase for NAD(P)H Regeneration. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (16), 5720–5727.
- (29) Yamamura, K.; Kaiser, E. T. Studies on the Oxidase Activity of copper(II) Carboxypeptidase A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, No. 20, 830–831.
- (30) Jing, Q.; Okrasa, K.; Kazlauskas, R. J. Stereoselective Hydrogenation of Olefins Using Rhodium-Substituted Carbonic Anhydrase—A New Reductase. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15* (6), 1370–1376.
- (31) Trynda-Lemiesz, L.; Pruchnik, F. P. Studies on the Interaction between Human Serum Albumin and [Rh₂(OAc)₂(bpy)₂(H₂O)₂](OAc)₂. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *66* (3), 187–192.
- (32) Okrasa, K.; Kazlauskas, R. J. Manganese-Substituted Carbonic Anhydrase as a New Peroxidase. *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12* (6), 1587–1596.
- (33) Ohashi, M.; Koshiyama, T.; Ueno, T.; Yanase, M.; Fujii, H.; Watanabe, Y. Preparation of Artificial Metalloenzymes by Insertion of Chromium(III) Schiff Base Complexes into Apomyoglobin Mutants. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (9), 1005–1008.
- (34) Neya, S.; Funasaki, N.; Imai, K. Structure and Function of the Myoglobin Containing Octaethylhemin as a Prosthetic Group. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (18), 8810–8815.
- (35) Hayashi, T.; Hisaeda, Y. New Functionalization of Myoglobin by Chemical Modification of Heme-Propionates. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35* (1), 35–43.

- (36) Mahy, J.-P.; Maréchal, J.-D.; Ricoux, R. Various Strategies for Obtaining Oxidative Artificial Hemoproteins with a Catalytic Oxidative Activity: from “Hemoabzymes” to “Hemozymes”? *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2014**, *18* (12), 1063–1092.
- (37) Mahy, J.-P.; Maréchal, J.-D.; Ricoux, R. From “hemoabzymes” to “hemozymes”: Towards New Biocatalysts for Selective Oxidations. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (13), 2476–2494.
- (38) Weber, P. C.; Wendoloski, J. J.; Pantoliano, M. W.; Salemme, F. R. Crystallographic and Thermodynamic Comparison of Natural and Synthetic Ligands Bound to Streptavidin. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (9), 3197–3200.
- (39) Chapman-Smith, A.; Cronan, J. E. In Vivo Enzymatic Protein Biotinylation. *Biomol. Eng.* **1999**, *16* (1–4), 119–125.
- (40) Collot, J.; Gradinaru, J.; Humbert, N.; Skander, M.; Zocchi, A.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Catalysis Based on Biotin–Avidin. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (30), 9030–9031.
- (41) González, M.; Argaraña, C. E.; Fidelio, G. D. Extremely High Thermal Stability of Streptavidin and Avidin upon Biotin Binding. *Biomol. Eng.* **1999**, *16* (1–4), 67–72.
- (42) Skander, M.; Humbert, N.; Collot, J.; Gradinaru, J.; Klein, G.; Loosli, A.; Sauser, J.; Zocchi, A.; Gilardoni, F.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes: (Strept)avidin as Host for Enantioselective Hydrogenation by Achiral Biotinylated Rhodium–Diphosphine Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (44), 14411–14418.
- (43) Klein, G.; Humbert, N.; Gradinaru, J.; Ivanova, A.; Gilardoni, F.; Rusbandi, U. E.; Ward, T. R. Tailoring the Active Site of Chemzymes by Using a Chemogenetic-Optimization Procedure: Towards Substrate-Specific Artificial Hydrogenases Based on the Biotin–Avidin Technology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (47), 7764–7767.
- (44) Qi, D.; Tann, C.-M.; Haring, D.; Distefano, M. D. Generation of New Enzymes via Covalent Modification of Existing Proteins. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (10), 3081–3112.
- (45) Rusbandi, U. E.; Lo, C.; Skander, M.; Ivanova, A.; Creus, M.; Humbert, N.; Ward, T. R. Second Generation Artificial Hydrogenases Based on the Biotin–Avidin Technology: Improving Activity, Stability and Selectivity by Introduction of Enantiopure Amino Acid Spacers. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349* (11–12), 1923–1930.
- (46) Rusbandi, U. E.; Skander, M.; Ivanova, A.; Malan, C.; Ward, T. R. Second-Generation Artificial Hydrogenases Based on the Biotin–avidin Technology: Improving Selectivity and Organic Solvent Tolerance by Introduction of an (R)-Proline Spacer. *Comptes Rendus Chim.* **2007**, *10* (8), 678–683.
- (47) Reetz, M. T.; Rentzsch, M.; Pletsch, A.; Maywald, M. Towards the Directed Evolution of Hybrid Catalysts. *Chim. Int. J. Chem.* **2002**, *56* (12), 721–723.
- (48) Reetz, M. T.; Rentzsch, M.; Pletsch, A.; Maywald, M.; Maiwald, P.; Peyralans, J. J.-P.; Maichele, A.; Fu, Y.; Jiao, N.; Hollmann, F.; Mondière, R.; Taglieber, A. Directed Evolution of Enantioselective Hybrid Catalysts: A Novel Concept in Asymmetric Catalysis. *Tetrahedron* **2007**, *63* (28), 6404–6414.
- (49) Reetz, M. T.; Peyralans, J. J.-P.; Maichele, A.; Fu, Y.; Maywald, M. Directed Evolution of Hybrid Enzymes: Evolving Enantioselectivity of an Achiral Rh-Complex Anchored to a Protein. *Chem. Commun.* **2006**, No. 41, 4318–4320.
- (50) Hyster, T. K.; Knörr, L.; Ward, T. R.; Rovis, T. Biotinylated Rh(III) Complex in Engineered Streptavidin for Accelerated Asymmetric C–H Activation. *Science* **2012**, *338* (6106).
- (51) Pierron, J.; Malan, C.; Creus, M.; Gradinaru, J.; Hafner, I.; Ivanova, A.; Sardo, A.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes for Asymmetric Allylic Alkylation on the Basis of the Biotin–Avidin Technology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (4), 701–705.

- (52) Pordea, A.; Mathis, D.; Ward, T. R. Incorporation of Biotinylated Manganese-Salen Complexes into Streptavidin: New Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Sulfoxidation. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694* (6), 930–936.
- (53) Pàmies, O.; Diéguez, M.; Bäckvall, J.-E. Artificial Metalloenzymes in Asymmetric Catalysis: Key Developments and Future Directions. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (8), 1567–1586.
- (54) Le Maux, S.; Bouhallab, S.; Giblin, L.; Brodkorb, A.; Croguennec, T. Bovine β -Lactoglobulin/Fatty Acid Complexes: Binding, Structural, and Biological Properties. *Dairy Sci. Technol.* **2014**, *94* (5), 409–426.
- (55) Brownlow, S.; Cabral, J. H. M.; Cooper, R.; Flower, D. R.; Yewdall, S. J.; Polikarpov, I.; North, A. C.; Sawyer, L. Bovine β -Lactoglobulin at 1.8 Å Resolution — Still an Enigmatic Lipocalin. *Structure* **1997**, *5* (4), 481–495.
- (56) Mercadante, D.; Melton, L. D.; Norris, G. E.; Loo, T. S.; Williams, M. A. K.; Dobson, R. C. J.; Jameson, G. B. Bovine β -Lactoglobulin Is Dimeric Under Imitative Physiological Conditions: Dissociation Equilibrium and Rate Constants over the pH Range of 2.5–7.5. *Biophys. J.* **2012**, *103* (2), 303–312.
- (57) Lyster, R. L. J. The Denaturation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in Heated Milk. *J. Dairy Res.* **1970**, *37* (2), 233–243.
- (58) Hillier, R. M.; Lyster, R. L. J. Whey Protein Denaturation in Heated Milk and Cheese Whey. *J. Dairy Res.* **1979**, *46* (01), 95.
- (59) Sakurai, K.; Goto, Y. Dynamics and Mechanism of the Tanford Transition of Bovine β -Lactoglobulin Studied Using Heteronuclear NMR Spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **2006**, *356* (2), 483–496.
- (60) Qin, B. Y.; Jameson, G. B.; Bewley, M. C.; Baker, E. N.; Creamer, L. K. Functional Implications of Structural Differences between Variants A and B of Bovine β -Lactoglobulin. *Protein Sci.* **1999**, *8* (1), 75–83.
- (61) Taulier, N.; Chalikian, T. V. Characterization of pH-Induced Transitions of β -Lactoglobulin: Ultrasonic, Densimetric, and Spectroscopic Studies 1 Edited by C. R. Matthews. *J. Mol. Biol.* **2001**, *314* (4), 873–889.
- (62) Kontopidis, G.; Holt, C.; Sawyer, L. Invited Review: Beta-Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87* (4), 785–796.
- (63) McMeekin, T. L.; Polis, B. D.; DellaMonica, E. S.; Custer, J. H. A Crystalline Compound of β -Lactoglobulin with Dodecyl Sulfate². *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71* (11), 3606–3609.
- (64) Nagase, H.; Woessner, J. F. Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (31), 21491–21494.
- (65) Loch, J. I.; Bonarek, P.; Polit, A.; Riès, D.; Dziejzicka-Wasylewska, M.; Lewiński, K. Binding of 18-Carbon Unsaturated Fatty Acids to Bovine β -lactoglobulin—Structural and Thermodynamic Studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *57*, 226–231.
- (66) Yang, M.-C.; Guan, H.-H.; Liu, M.-Y.; Lin, Y.-H.; Yang, J.-M.; Chen, W.-L.; Chen, C.-J.; Mao, S. J. T. Crystal Structure of a Secondary Vitamin D₃ Binding Site of Milk β -Lactoglobulin. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2008**, *71* (3), 1197–1210.
- (67) Frapin, D.; Dufour, E.; Haertle, T. Probing the Fatty Acid Binding Site of Beta-Lactoglobulins. *J. Protein Chem.* **1993**, *12* (4), 443–449.
- (68) Chevalley, A.; Salmain, M. Enantioselective Transfer Hydrogenation of Ketone Catalysed by Artificial Metalloenzymes Derived from Bovine β -Lactoglobulin. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (98), 11984–11986.
- (69) Chevalley, A.; Cherrier, M. V.; Fontecilla-Camps, J. C.; Ghasemi, M.; Salmain, M. Artificial Metalloenzymes Derived from Bovine β -Lactoglobulin for the Asymmetric

- Transfer Hydrogenation of an Aryl Ketone--Synthesis, Characterization and Catalytic Activity. *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003 **2014**, 43 (14), 5482–5489.
- (70) Buron, C.; Sénéchal-David, K.; Ricoux, R.; Le Caër, J.-P.; Guérineau, V.; Méjanelle, P.; Guillot, R.; Herrero, C.; Mahy, J.-P.; Banse, F. An Artificial Enzyme Made by Covalent Grafting of an FeII Complex into β -Lactoglobulin: Molecular Chemistry, Oxidation Catalysis, and Reaction-Intermediate Monitoring in a Protein. *Chem. – Eur. J.* **2015**, 21 (34), 12188–12193.

CHAPITRE 2

I. Complexes à pinces rappel bibliographique.

1. Structure

La catalyse au palladium est l'un des outils synthétiques les plus importants dans la synthèse organique. Une caractéristique intéressante de la catalyse au palladium est sa large portée et la possibilité de contrôler la sélectivité. Un catalyseur idéal doit être stable et hautement sélectif, mais aussi très actif et permettre l'utilisation de peu de catalyseur. De plus, il doit être adapté à une conception rationnelle, donnant la possibilité d'affiner les propriétés catalytiques du centre métallique. Ces problèmes peuvent être résolus par un choix approprié de ligands. Une des stratégies consiste à utiliser des ligands tridentés, tels que des ligands à pinces, pour créer une liaison métal-ligand bien définie. En 1976, Moulton et Shaw ont synthétisé pour la première fois un ligand de type pince. Lors de cette étude, le ligand et les complexes utilisés représentaient des systèmes tridentés diphosphines originaux obtenus *via* un mécanisme de cycloméallation (Figure 18).¹

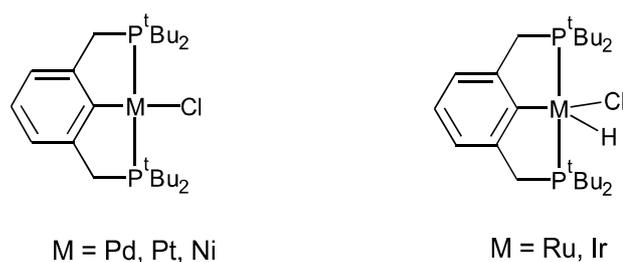


Figure 18 : Premiers complexes à pinces PCP de Shaw.

Ensuite, l'exploration des composés pince-métal s'est développée principalement selon la nature des différents atomes donneurs avec van Koten², et Noltes³, un grand nombre de complexes à pinces ont été synthétisés et étudiés dans de multiples applications catalytiques. Au cours des 20 premières années, les chercheurs se sont principalement concentrés sur les ligands à pince ECE avec un noyau central phényle, lié par son atome de carbone anionique à

une unité cationique ML_n et ayant deux substituants ortho- CH_2E similaires ($E = PR_2$, est PCP; $E = SR$, est SCS; $E = NR_2$, NCN), en coordination avec le métal via ses donneurs E. ⁴ Alors que la chimie des complexes à pince se concentrait principalement sur l'utilisation de ligands PCP et de ligands SCS (avec P ou S comme atome donneur), les chercheurs ont commencé à appliquer les ligands NCN (avec les groupements donneurs N sp^3 ou sp^2 "dur").

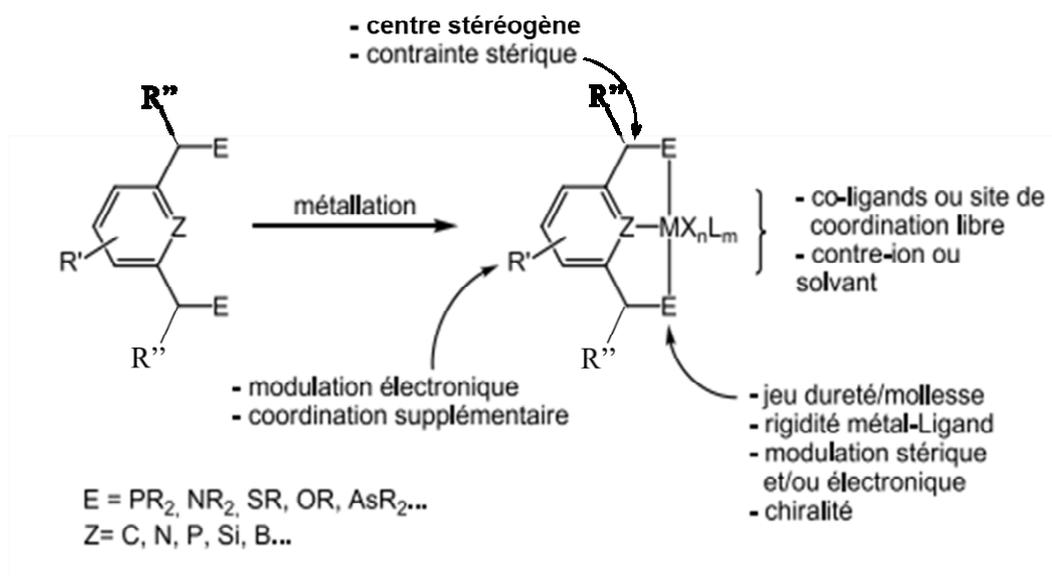


Figure 19 : Structure des complexes à pinces

De nombreuses définitions sont possibles pour les complexes à pince. La définition la plus générique est de parler de complexes métalliques présentant un ligand tridenté formant deux cycles adjacents et généralement coplanaires. La Figure 19 ci-dessus présente un aperçu des différentes modulations qu'il est possible d'apporter à un squelette pince classique afin d'influer sur les propriétés stériques et électroniques du complexe, et ainsi contrôler la réactivité de celui-ci. Par exemple, le simple remplacement d'un azote par un phosphore au niveau des groupements donneurs latéraux va fortement changer la densité électronique du centre métallique. Par ailleurs, la présence de bras latéraux asymétriques sur le ligand peut induire une réactivité stéréosélective du complexe métallique. ⁵

Ces complexes à pince permettent d'accéder à des propriétés importantes pour les réactions catalytiques. À cet égard, ils présentent des caractéristiques intéressantes. Un premier exemple est la stabilité des espèces catalytiques lors des transformations organiques. Plusieurs complexes à pinces sont des espèces remarquablement stables, en raison de leur structure de chélation ternaire et de l'existence de la liaison sigma carbone-métal. Il est établi que cette

liaison est responsable de la stabilité unique de ces complexes, évitant ainsi la dissociation du métal, du ligand et donc la décomposition du complexe. De plus, les atomes donneurs et leurs substituants permettent la modulation fine des propriétés stériques et électroniques. En outre, la modification de ces substituants a permis plus récemment d'intégrer des centres stéréogènes capables d'induire la chiralité au cours d'un processus donné.

Une autre conséquence importante de la coordination est que le nombre de sites de coordination libres sur le métal est réduit à 1.^{6, 7} Ce nombre relativement faible de sites de coordination accessibles sur l'atome métallique représente souvent un facteur important pour augmenter la régiosélectivité et la stéréosélectivité des transformations organiques ou pour modifier la réactivité de l'atome métallique. Le troisième facteur important est la structure stoechiométrique et de liaison bien définie des complexes à pinces, ce qui facilite la réaction catalytique, ainsi qu'un ajustement efficace des propriétés catalytiques. Au vu des avantages énoncés précédemment, l'intérêt que présentent les complexes à pinces comme catalyseurs dans les transformations organiques est clairement justifié. De nombreuses publications ont clairement montré que les réactions catalysées par des métaux de transition peuvent être considérablement améliorées et ajustées par l'utilisation de catalyseurs de type complexes à pinces. De plus, de nouvelles voies synthétiques ne pouvant être appliquées avec des catalyseurs habituellement utilisés peuvent être ouvertes par l'utilisation de ces espèces.^{7, 8}

2. Mode de coordination

De nombreuses différences de liaison observées entre les ligands NCN et OCO d'une part et les ligands PCP et SCS sont liées aux différences dans les propriétés de coordination des différents atomes donneurs : les atomes donneurs N et O sont des donneurs σ tandis que les atomes donneurs de type phosphine possèdent à la fois des propriétés σ -donneur et π -accepteur. De plus, les facteurs stériques affectent également le mode de liaison réel du ligand à pince. En comparant les ligands NCN et PCP, il est probable que la différence de rayon atomique entre N et P rende les contraintes stériques dans les groupes R_2N vs R_2P dominantes, c'est-à-dire que la liaison M-P est plus longue que la liaison M-N. De plus, l'augmentation de la taille des groupes R dans le groupement R_2N affecte grandement la basicité de Lewis de ce groupement.^{9, 10} Il est à noter que les substituants amine libre (non coordonnés) peuvent représenter une contrainte stérique au site de coordination de la liaison C_{ipso} -M. Cet aspect a été observé dans les complexes qui contiennent soit un ligand NCN

monodenté au métal, soit formé des deux N liés au métal. Souvent, cette interférence stérique peut provoquer des réarrangements inter ou intramoléculaires du motif pince-métal. ¹¹

La différence dans les propriétés de liaison des divers groupements donneurs a récemment été observée dans des complexes hybrides ECE. Par exemple, dans les complexes à pince métal-d⁸ SCP, la phosphine est liée tandis que le substituant ortho-sulfure reste en grande partie non coordonnant (Figure 20). Les différentes propriétés des donneurs et une coordination plus labile du "bras" sulfuré par rapport à la phosphine permet l'accès à un site vacant supplémentaire. Sur le plan structural et électronique ainsi que topologique, ce complexe peut être considéré comme un hybride entre les complexes à pince PCP et SCS. Le complexe [PdCl (PCS)] agit comme pré-catalyseur dans la réaction de condensation d'aldol entre le méthylisocyanoacétate et le benzaldéhyde. Il est proposé que ce complexe subisse initialement la réaction d'insertion avec le méthylisocyanoacétate par libération sélective du bras S-donneur. Le complexe imidoyl-Pd résultant agit alors comme catalyseur. L'activité catalytique de ce complexe est supérieure à celle des complexes à pince symétriques SCS, PCP et NCN de palladium. Donc un complexe avec une coordination hémilabile efficace semble le rendre adaptable aux différents systèmes électroniques, stériques et aux exigences de coordination pendant les différentes étapes d'un cycle catalytique. ¹²

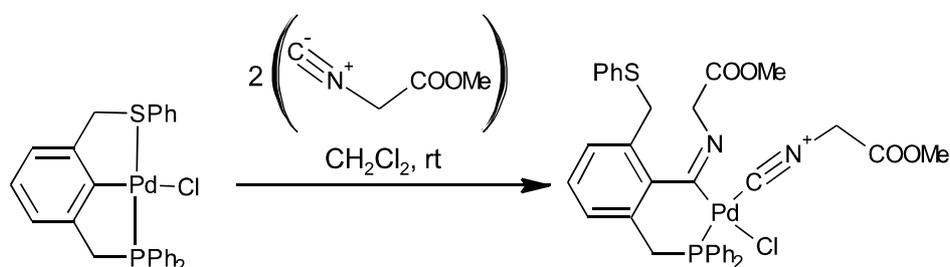


Figure 20 : Hémilabilité du complexe mixte PCS.

Étonnamment, à notre connaissance, il existe peu de ligands à pinces dans lesquelles le caractère hémilabile a été sélectivement modifié et ajusté pour modifier le comportement de coordination de tri- à bidentate. Un tel contrôle sur le mode de coordination du ligand se révèle intéressant pour bien comprendre l'impact de cette propriété lors de réactions catalytiques. En outre, de nouveaux modes de complexation adaptatifs pourraient également conduire à une réactivité nouvelle.

3. ArMs – Complexe à pince

Le palladium a été jusqu'à présent très peu utilisé dans la construction d'ArMs. Néanmoins, des complexes à pince ont déjà été utilisés pour la construction de *métalloprotéines* artificielles.¹³ Les premières études ont montré qu'il était possible d'insérer des complexes à pince de palladium et platine dans des lipases. Pour cela, le groupement hydroxyle de la sérine du site actif a été exploité pour une modification spécifique de site avec des ligands organiques. Pour contourner les modifications multiples de sérines, l'idée a été émise d'utiliser des dérivés phosphonate comme unités d'ancrage, afin d'obtenir une modification dirigée sur un seul site. Les phosphonates sont des inhibiteurs sélectifs des hydrolases de sérine et sont capables de réagir sélectivement en présence d'autres résidus sérine dans l'enzyme. Le concept a été appliqué d'abord par Reetz et ses collègues. En utilisant un phosphonate, ils ont incorporé un ligand diphosphane dans la lipase de *Bacillus subtilis* (Schéma 1). Cependant, l'hybride résultant était instable et, après 24 h, l'inhibiteur s'hydrolyse dans l'eau.

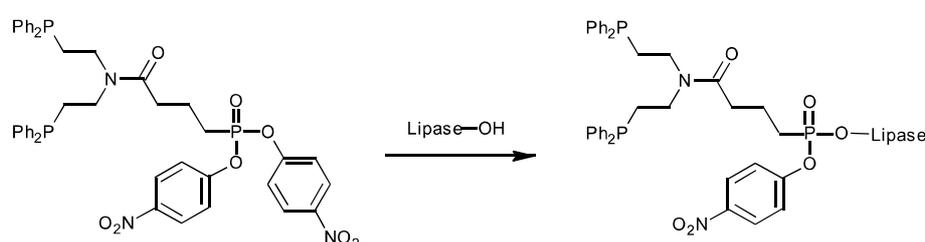


Schéma 1 : Ancrage de ligand diphosphane par liaison covalente à la lipase.

Pour éviter l'hydrolyse du second groupe partant p-nitrophénol, van Koten et ses collaborateurs l'ont remplacé par de l'éthanol. Une petite série de phosphonates a été synthétisée et couplée de manière covalente à différents complexes métalliques à pince ECE à travers une attache propylique (Schéma 2). Les complexes organométalliques phosphonate-pince-métal ont été couplés avec succès au résidu Ser120 de la lipase cutinase. Les hybrides obtenus sont stables dans des solutions tampons et tolèrent des conditions de purification aqueuse par dialyse, mais jusqu'à présent ils n'ont pas été testés en catalyse.

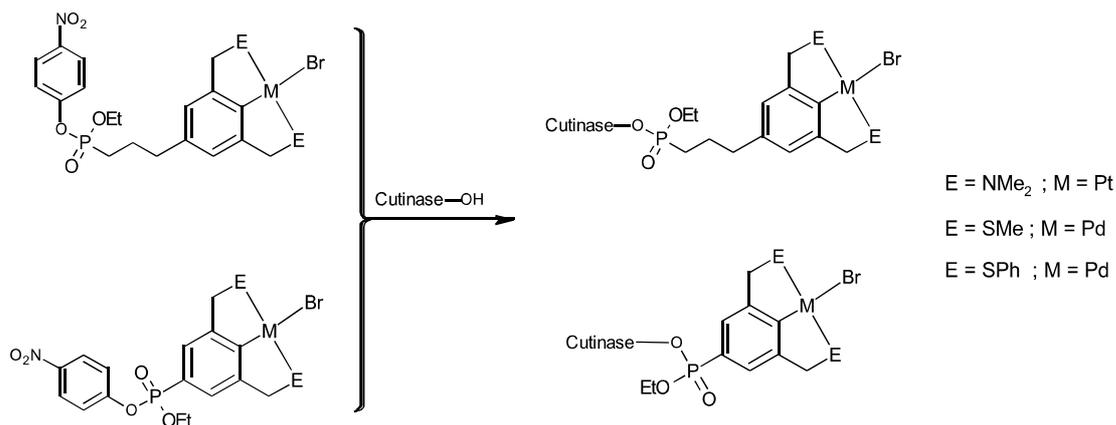


Schéma 2 : Ancre de différents complexes à pince dans la lipase cutinase.

La présence de l'espaceur propyle place le centre métallique de la pince ECE hors de la protéine cutinase, comme cela a été montré par modélisation. L'emplacement à l'extérieur du centre métallique permet différentes orientations de celui-ci. Par conséquent, la chiralité induite par l'environnement protéique dans les réactions catalysées par ce complexe pince-métal sera plus faible. Pour obtenir un contact plus étroit entre le groupe pince-métal et l'environnement chiral de la protéine, il a été synthétisé différents hybrides de pince-métal-cutinase dans lesquels le lien propyle a été éliminé et le complexe pince-métal a été directement fixé au groupe phosphonate (Schéma 2).¹⁴ La nature du groupe ECE est également importante, comme cela a été montré par les structures cristallines de la cutinase modifiée par ancrage covalent. Les inhibiteurs ECE-pince-platine et palladium occupent des poches différentes dans le site actif de la cutinase et imposent une stéréochimie différente sur l'atome de phosphore. La cutinase a été traitée avec ces phosphonates organométalliques et les nouveaux hybrides complexe/protéine ont été identifiés comme contenant exactement une unité organométallique par protéine. Les principaux avantages de cette stratégie sont: qu'un métal de transition peut être introduit de manière régiosélective et, par conséquent, l'environnement métallique peut être affiné; la fixation covalente de complexes à pinces organométalliques à une enzyme est obtenue, ce qui empêchera la perte des métaux à partir de ces hybrides. L'approche présentée ici peut être considérée comme un outil dans le développement de catalyseurs régio- et énantiosélectifs ainsi que des sondes analytiques pour étudier les propriétés enzymatiques.

Sur le même modèle de catalyseur hybride, une métalloenzyme capable de catalyser la réaction de couplage croisé de Heck a été conçue. Pour cela, Palomo et al. ont réalisé la

synthèse du complexe pince de palladium comprenant une fonction p-nitrophenylphosphate et ont réalisé son insertion dans une lipase par la même accroche covalente que précédemment.

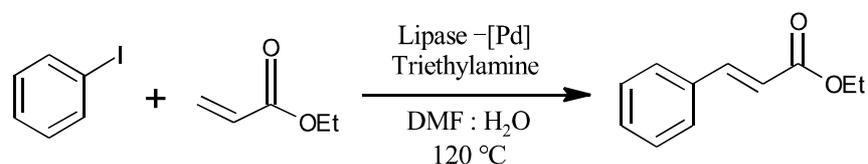


Schéma 3 : Réaction de couplage croisé de Heck

Après la formation de la métalloenzyme, l'ensemble est immobilisé sur différents supports afin de connaître la meilleure orientation pour la réaction de Heck. Avec cet ensemble deux types de réactions de Heck ont été testés ; la première entre l'iodobenzène et l'acrylate d'éthyle avec un rendement quantitatif à 70°C dans le DMF avec 25% d'eau (Schéma 3). Après optimisation des meilleures conditions de sélectivité le meilleur catalyseur hybride sélectionné a permis de catalyser une réaction de Heck asymétrique entre l'iodobenzène et le 2,3-dihydrofurane avec de bonnes stéréo- et énantiosélectivités (Schéma 4).¹⁵

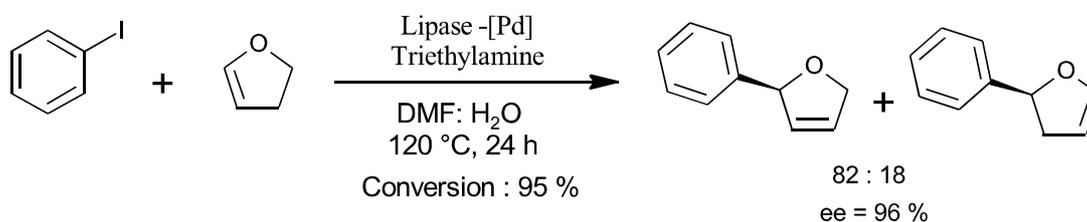


Schéma 4 : Réaction de Heck asymétrique entre l'iodobenzène et le 2,3-dihydrofurane.

4. ArMs –Pd

D'autres métalloenzymes artificielles mettant en jeux des complexes de palladium ont été reportées. L'équipe de Ward a rapporté la construction d'une ArM capable de catalyser la réaction d'alkylation allylique asymétrique (Schéma 4). Ils ont montré qu'il était possible d'insérer le complexe $[\text{Pd}(\eta^3\text{-Ph}_2\text{allyl})\text{Biotin}]^+$ dans la streptavidine afin d'obtenir les produits d'alkylation S ou R avec des rendements allant jusqu'à 90% et des ee de 82%. Dans ce cas

l'optimisation génétique par mutation à la position S112 a permis d'augmenter la conversion ainsi que l'ee. ¹⁶

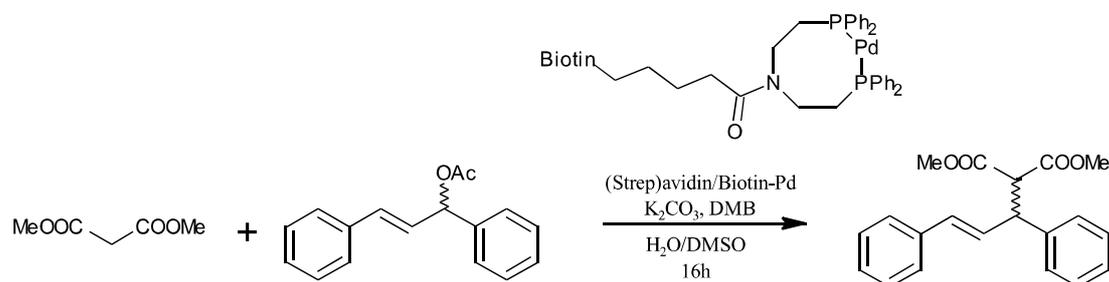


Schéma 5 : Réaction d'alkylation allylique asymétrique

En 2004, Watanabe a rapporté une stratégie pour la construction d'un biocatalyseur d'hydrogénation.⁽¹⁶⁾ Il a été décrit l'encapsulation d'un cluster de Pd dans la cavité de l'apo-ferritine (Fr), une protéine de stockage du fer comprenant 24 sous-unités qui s'assemblent pour former une structure creuse de type cage de 1 à 12 nm de diamètre. Les petits canaux, essentiels pour le transport de petites molécules, sont situés aux jonctions des sous-unités. Il est intéressant de noter que l'apo-ferritine peut être facilement exprimée par une méthode recombinante et reconstituée avec une variété de métaux non endogènes. Ce catalyseur hybride de ferritine a été capable de catalyser l'hydrogénation de différents dérivés d'acrylamide dans l'eau. Ils ont démontré la synthèse in situ de nanoclusters de Pd dans une cage protéique afin de réaliser l'hydrogénation sélective d'oléfine en milieu aqueux. ¹⁷

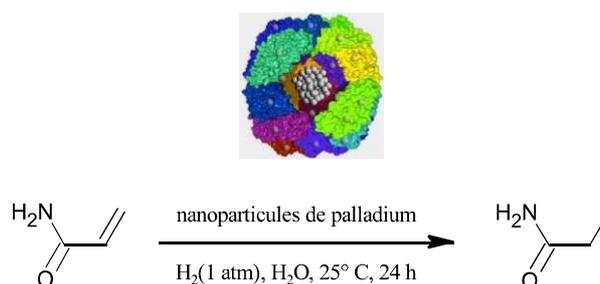


Schéma 6 : Réduction d'acrylamide par des nanoparticules de palladium introduites dans la ferritine.

II. Synthèse de ligands

Nous voulions préparer des ligands XCX hémilabiles dont on pourra aisément faire varier la structure. Pour cela, le choix du substrat de départ est important car il doit pouvoir être fonctionnalisé facilement avec différentes chaînes aliphatiques et permettre d'introduire des groupements donneurs sur les bras coordonnant le métal.

Ainsi sur des complexes de type pince différentes longueurs de chaîne seront introduites grâce à une fonction amine pour permettre l'insertion dans la protéine. Ensuite différents groupements pourront être insérés de manière à se complexer au palladium introduit par la suite. (Figure 21)

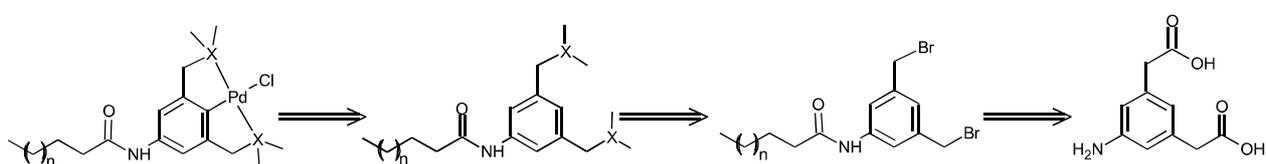


Figure 21 : Rétrosynthèse des complexes de palladium.

C'est pourquoi afin de réaliser la synthèse des ligands à pinces, l'acide aminoisophtalique (**1**), commercialement disponible, est utilisé comme molécule de départ. En effet, la fonction amine va permettre l'introduction des chaînes aliphatiques pour l'assemblage à la β -Lg et les groupements acides carboxyliques eux vont permettre d'accéder aux bras chélatants. Pour commencer, les 2 fonctions acides sont estérifiées en ester éthylique afin de faciliter leur réduction en alcool. En effet, la réduction directe par NaBH_4 des acides en alcools a conduit seulement à la dégradation du produit de départ. C'est pourquoi il a été nécessaire de passer par une étape d'estérification. Le diester **2** est obtenu en chauffant à reflux dans l'éthanol et pendant 4 h en présence de chlorure de thionyle avec un rendement de 89 %. Enfin une fois le composé **2** obtenu la réduction des esters en alcools est réalisée par traitement avec LiAlH_4 et donne le composé **3** attendu avec 96% de rendement.

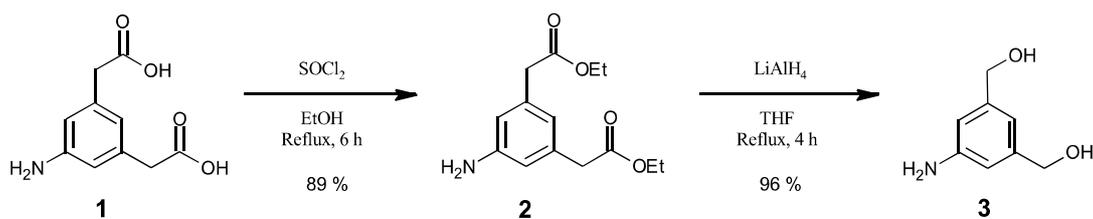


Schéma 7 : Synthèse du (3-amino-5-éthylphényl)méthanol **3**.

L'acylation du groupe amino de **3** a été effectuée pour introduire les chaînes aliphatiques. Pour cela, différentes méthodes ont été envisagées. Dans un premier temps, le composé **3** est couplé à l'acide laurique. Pour ce faire, un couplage peptidique est envisagé avec le DCC comme agent de couplage et le HOBt comme activateur.¹⁸ Dans ces conditions, le produit **4-I** est obtenu au bout de 48 h, avec un rendement moyen de 50 %. Cependant la purification de ce produit est difficile car la N,N'-dicyclohexylurée (DCU) formée lors de la réaction possède la même solubilité que le produit **4-I**. C'est pourquoi l'EDCI a été choisi à la place du DCC.¹⁹ En effet, l'urée formée dans le cas de l'EDCI est cette fois-ci soluble dans l'eau, alors que le produit **4-I** ne l'est pas. Ce produit est ainsi purifié par un simple lavage à l'eau. Cette méthode a grandement facilité le traitement de la réaction même si le rendement reste modeste.

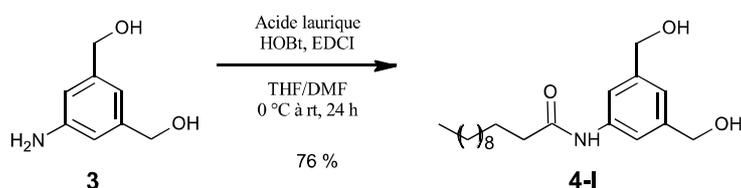


Schéma 8 : Fonctionnalisation avec la chaîne laurique

Les tentatives pour préparer le composé **4-p** par réaction de l'acide palmitique en présence de DCC ou d'EDCI ont échoué ou ont donné des rendements médiocres. Une autre stratégie a été employée pour synthétiser le dérivé de l'acide palmitique **4-p** avec cette fois l'utilisation du 1-palmitoyl-1H-1,2,3-benzotriazole préparé préalablement. Cette méthode développée au préalable par N. Vologdin, ATER dans l'équipe, a permis d'obtenir le composé **4-p** avec un rendement de 90%. Enfin pour éliminer le benzotriazole formé, un simple lavage à l'eau du composé suffit.

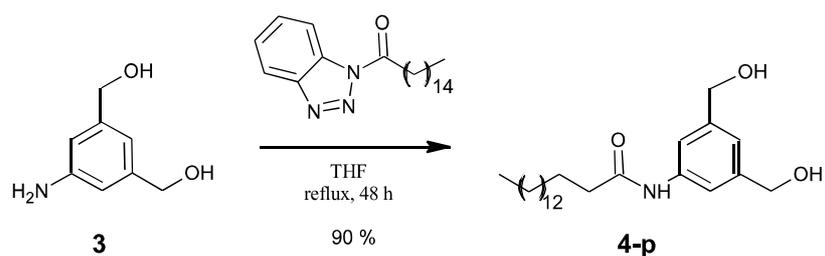


Schéma 9 : Fonctionnalisation avec la chaîne palmitique

L'introduction de la chaîne stéarique a été réalisée par réaction du chlorure de stéaroyl pour donner le composé **4-s**, après 16 h à température ambiante avec un rendement de 87%. Par cette approche le composé est plus facilement isolé ; en effet seul un lavage est nécessaire pour fournir **4-s**.

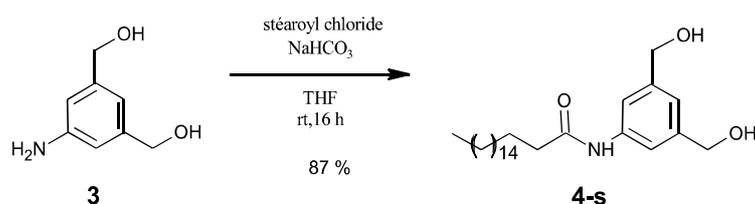


Schéma 10 : Fonctionnalisation avec la chaîne stéarique

Une fois les composés **4-l**, **4-p** et **4-s** obtenus, la synthèse des ligands suit une procédure commune. Dans un premier temps, les diols **4** sont transformés en composés dibromés **5-l**, **5-s** et **5-p** à l'aide de l'acide bromhydrique dans l'acide acétique. La RMN ^1H ne diffère pas beaucoup entre les composés **4** et **5**, à l'exception du **NH** qui subit un blindage de 2 ppm. En effet, les composés **4** possédant les fonctions hydroxyles montrent un déblindage du proton **NH** aux environs de 8,2 ppm, alors que pour les composés bromés **5**, le NH sort avec les protons aromatiques aux alentours de 7,5 ppm. De plus il y a une grande différence de solubilité entre les composés **4** et **5**. En effet les composés **4** sont faiblement solubles dans la majorité des solvants organiques et notamment le chloroforme, alors que les composés **5** eux montrent une bien meilleure solubilité dans ces solvants. Cette différence de solubilité entre **4** et **5** confirme bien la formation des composés **5**.

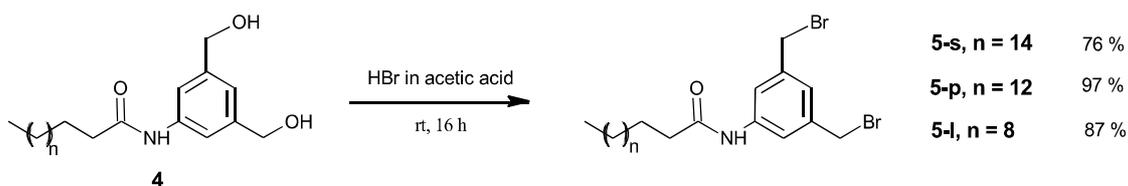


Schéma 11 : Bromation des groupements hydroxy.

Les dérivés dibromés **5** ont par la suite été facilement transformés en ligands à pinces **6** (Schéma 11). Ainsi une série de substitutions nucléophiles est réalisée pour donner les composés soufrés **6d** ou aminés **6a,b,c** avec de très bons rendements.

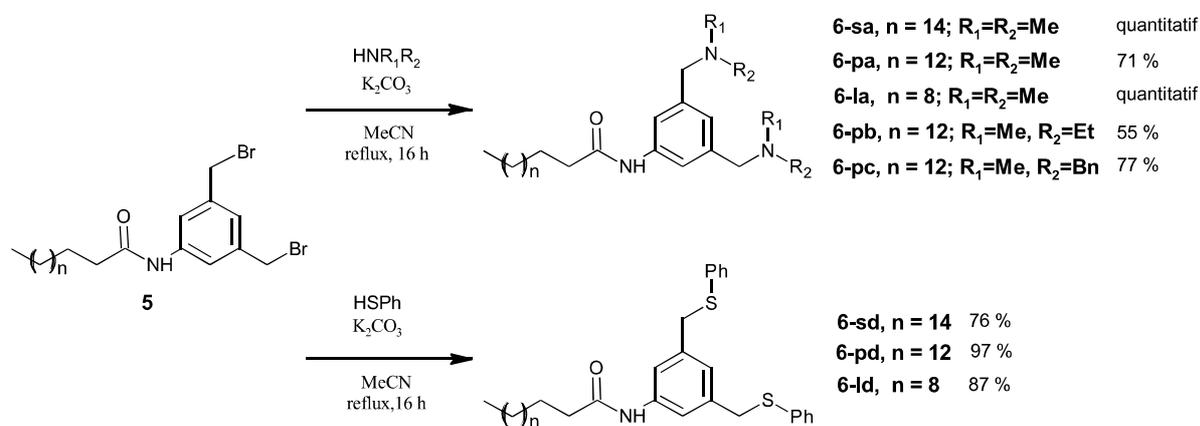


Schéma 12 : Synthèse des ligands à pince par substitution nucléophile

III. Préparation des complexes Pd[XCX]

Les complexes à pinces peuvent être préparés de différentes façons. En regardant l'ensemble des méthodes mises en place dans la littérature, il ressort qu'il existe trois voies principales de formation de ces complexes à pince : par activation de liaison C-H, activation de liaison C-X (avec X étant un halogène) ou par transmétallation.

1. Activation de la liaison C-H

a. Ligands SCS

La première réaction d'activation CH a été rapportée en 1965 par Joseph Chatt avec l'insertion d'un atome de ruthénium dans la liaison C-H arène (type benzène, naphthalène, anthracène et phénanthrène).²⁰ L'activation C-H est l'une des voies les plus utilisées

permettant d'obtenir la liaison σ entre le carbone et le métal. Cette approche comporte de nombreux avantages comme le fait que le ligand ne nécessite aucune fonctionnalisation préalable pour l'insertion du métal de transition dans la liaison C-H. Cette voie a été la première utilisée dans le cas des complexes à pinces par Shaw lors de la formation de ses complexes PCP.¹ Cependant l'inconvénient majeur de cette approche réside dans le fait que pour réaliser cette réaction il faut en général chauffer la solution à haute température et sur des temps assez longs ce qui peut occasionner la détérioration des produits et/ou réactifs. Néanmoins la grande stabilité thermique des complexes à pince minimise cet inconvénient.

Pour former la liaison C-Pd l'activation d'une liaison C_{sp^2} -H est favorisée par rapport à une liaison C_{sp^3} -H, et est généralement observée dans les réactions d'insertion métalliques.²¹ En effet la liaison C_{sp^2} -Pd formé est plus forte que la liaison C_{sp^3} -Pd. Un complexe à pince basé sur un squelette aryle possédant un C_{sp^2} sera plus facilement formé et plus stable qu'avec un C_{sp^3} . Quelques exemples de platinacycles formés par l'activation de la liaison C-H aliphatique ont été signalés.²² Bien sûr, l'activation C-H directe dépend de plusieurs facteurs, les principaux étant la nature des groupements donneurs latéraux et celle du précurseur métallique. Ainsi, il est judicieux d'orienter le choix des bras azotés, soufrés, ou phosphorés en fonction du métal visé. De la même manière, le simple changement de substituants sur l'hétéroélément donneur peut radicalement changer les conditions de réaction et la possibilité de la formation du complexe.

Pour les complexes à pince SCS **7d**, la synthèse a été réalisée en suivant les travaux de Bergbreiter et al. qui avaient réalisé l'insertion du palladium par C-H activation sur des ligands de type SCS similaire au composé **6d**,²³. Ces conditions permettent d'obtenir les complexes **7d** avec des rendements de 40 à 70%. Il est à noter que la purification du complexe SCS **7-ld** est assez difficile. En effet, le produit cristallise difficilement dans l'acétonitrile ce qui peut expliquer le rendement moyen. Il est aussi possible de voir que le rendement augmente avec des longueurs de chaîne plus grandes. Avec les complexes de l'acide palmitique **7-pd** et stéarique **7-sd**, on constate une amélioration de la recristallisation qui est probablement due à l'augmentation de la longueur de la chaîne aliphatique qui favorise la précipitation.

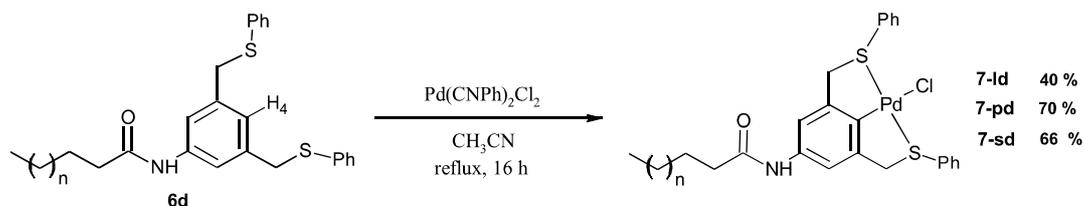


Schéma 13 : C-H activation des ligands 6d.

Lors de la synthèse des complexes SCS **7-ld**, **7-pd**, et **7-sd**, la liaison du soufre au palladium par son doublet non liant peut permettre la formation de deux conformères qui seraient en équilibre (Schéma 14). Lorsque l'on regarde le spectre RMN ^1H du composé **7-sd**, un élargissement assez important des pics des CH_2 benzylique est observé. Cet élargissement peut être provoqué par un équilibre entre les différents conformères formés. Il existe une équivalence magnétique des quatre protons benzyliques. Cela peut être interprété de deux façons : (i) Les substituants phényle sur chaque soufre possèdent le même environnement chimique et les deux cycles cyclométallés sont coplanaires avec le cycle aryle. Dans une structure aussi peu probable, voir le Schéma 14, la molécule possède un plan miroir à travers le plan aryl perpendiculaire au plan de coordination.²⁴ (ii) il y a également deux positions différentes pour les substituants Ph avec un carbone benzylique maintenu en dessous et le second carbone benzylique maintenu au-dessus du plan de coordination. On peut donc supposer qu'il existe un processus intramoléculaire rapide impliquant l'interconversion conformationnelle des cycles cyclométallés (Schéma 14) qui provoque cet élargissement en RMN.

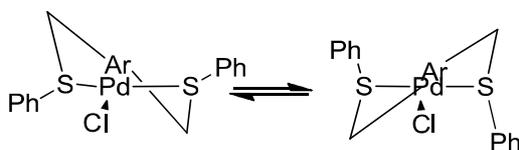


Schéma 14 : Equilibre des conformères

Afin d'améliorer le rendement de la synthèse du complexe de palladium **7-ld**, d'autres sources de palladium (II) ont été testées. Il a donc été choisi des précurseurs avec des groupements capables de faciliter l'insertion du palladium. Dans un premier temps le $\text{Pd}(\text{NH}_4)_2\text{Cl}_2$ a été testé sans résultat. Ainsi au bout de 16 h à température ambiante aucun complexe n'est formé, seul le produit de départ est retrouvé. Ensuite le $[\text{Pd}(\text{allyl})\text{Cl}]_2$ est utilisé mais cette fois en

présence d'éther, le complexe **7-ld** est obtenu mais en très petite quantité avec seulement 3 % de rendement. Afin de pouvoir chauffer légèrement la réaction et ainsi activer la réaction, le dichlorométhane est utilisé comme solvant. Cependant après 16h de reflux le complexe **7-ld** n'est pas formé, et la dégradation du produit de départ est observée. Dans le cas du complexe **7-ld** le meilleur précurseur est le palladium $\text{Pd}(\text{PhCN})_2\text{Cl}_2$.

	Solvant	Conditions	Rendement %
$\text{Pd}(\text{PhCN})_2\text{Cl}_2$	CH_3CN	16 h reflux	40
$(\text{NH}_4)_2\text{PdCl}_4$	CH_3CN	16 h t.a	0
$[\text{Pd}(\text{allyl})\text{Cl}]_2$	Et_2O	16 h t.a	3
$[\text{Pd}(\text{allyl})\text{Cl}]_2$	CH_2Cl_2	16 h reflux	0

Tableau 1 : Différentes conditions de C-H activation de 7-ld

b. Ligands NCN

Avec les ligands azotés, la même « C-H activation » que pour les composés soufrés **7d** par le $\text{PdCl}_2(\text{PhCN})_2$ est également réalisée sur le composé **6-la** et conduit au produit escompté **7-la**. En effet, par analyse RMN ^1H sur le brut réactionnel, un déblindage des CH_2 benzyliques est observé, ainsi que la disparition du H_{ipso} ce qui laisse supposer la formation du complexe **7-la**. De plus, la RMN ^{13}C confirme la disparition du C- H_{ipso} aromatique et la formation d'un carbone quaternaire. Cependant le rendement de 25 % reste modeste.

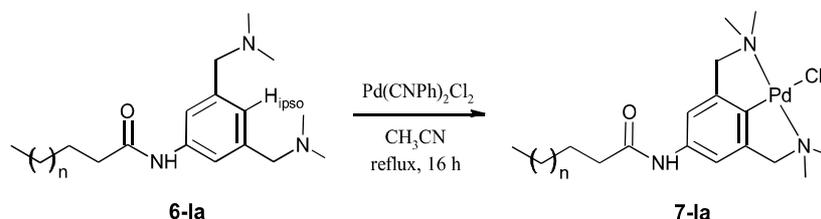


Schéma 15 : C-H activation du ligand 6-la

2. Transmétallation

La transmétallation est une méthode utilisée généralement lorsque la méthode précédente reste infructueuse. Dans le cas de l'utilisation de métaux peu enclins à l'activation de liaison C-H ou à l'addition oxydante, ce qui concerne notamment les métaux précoces ou tardifs du groupe 11 comme l'or. Cette méthode implique plusieurs modifications du ligand, utilisant parfois des produits et des intermédiaires sensibles à l'air et à l'humidité. Cette modification va alors donner une meilleure sélectivité et/ou faisabilité de formation du métallacycle. Les intermédiaires lithiés font partie des intermédiaires très répandus pour la transmétallation et concerne principalement les métaux précoces (groupe 4 notamment), généralement moins enclins à l'activation C-H. Les complexes de lithium sont généralement sensibles et la plupart générés in-situ. L'exemple du Schéma 16 présente un cas où le complexe de lithium est isolé et dont la structure est caractérisée par diffraction des rayons X.²⁵

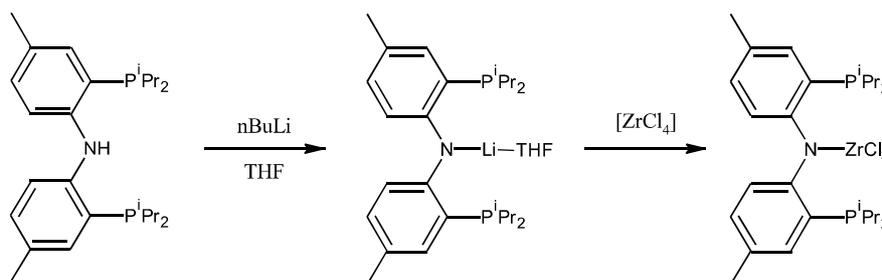


Schéma 16 : Transmétallation par un intermédiaire lithié.

Ces complexes de zirconium préparés par Ozerov servent de point de départ à la préparation de complexes alkyle et alkylidène de zirconium. Le zirconium ayant en général plus d'affinité pour des donneurs plus durs que les phosphines, comme les bras azotés par exemple, cette méthode de transmétallation facilite la formation du complexe pince. Cette méthodologie a ensuite été utilisée par le même groupe pour la préparation de complexes pince de titane.²⁶

Une autre méthode de transmétallation a été utilisée pour la synthèse en passant cette fois par les complexes mercuriques. L'exemple cité ici est la synthèse du complexe de palladium 1,3-bis(2-pyridyl) benzène (NCHN), qui a été réalisée pour la première fois grâce à une réaction de transmétallation. Les complexes ont été obtenus par réaction du Pd(OAc)₂ sur le précurseur organomercuré (II) [Hg(NCN)Cl]. Les nouvelles espèces ont été, par la suite, caractérisées en

solution et les complexes de palladium formés ont été par la suite utilisés comme catalyseurs dans la réaction de Heck entre l'iodobenzène et de l'acrylate de méthyle.²⁷

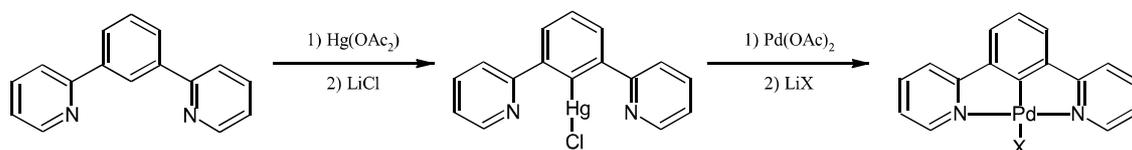


Schéma 17 : Transmétallation par le mercure

Pour notre part, et comme les tentatives de métallation directe des ligands pince NCN **6a**, **6b**, **6c** avec le complexe $[(\text{PhCN})\text{PdCl}_2]$ a donné de faibles rendements, la transmétallation par le mercure a été envisagée. Ainsi, la synthèse des complexes pinces NCN a été effectuée en deux étapes (Schéma 18)

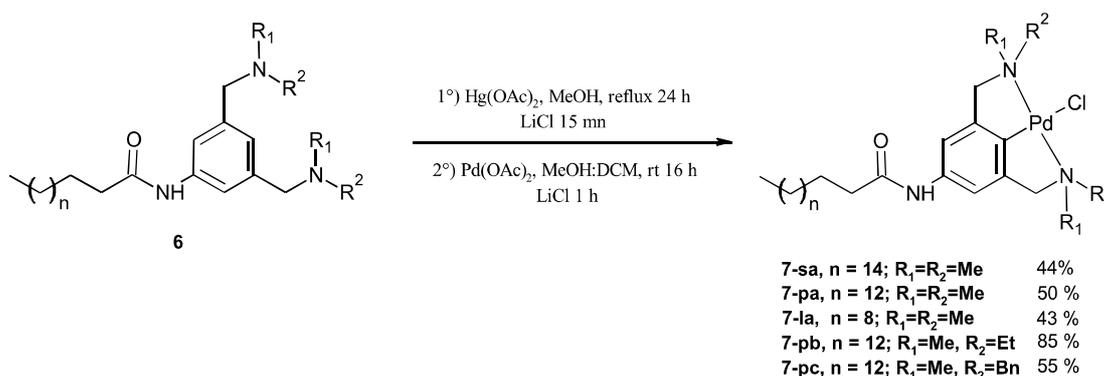


Schéma 18 : Transmétallation des ligands **6a,b,c**.

En traitant à chaud en présence de LiCl, les composés **6** avec $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, on obtient les dérivés mercuriques intermédiaires qui subissent ensuite une réaction de transmétallation dans des conditions douces et avec $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ pour **7-la**, **7-pa**, **7-pb**, **7-pc** et **7-sa** avec un rendement modéré. La formation des complexes de palladium a été mise en évidence par la disparition du signal du proton aromatique en position para de l'amide et également le déblindage de 0,4 ppm des deux protons en position ortho. En revanche, les protons méthyliques et benzyliques de **7** ont subi un blindage de 0,7 et 0,5 ppm, respectivement. Dans la RMN ^{13}C , les signaux de carbones méthyliques et benzyliques ont également subi un blindage de 8 et 12 ppm respectivement, et le signal du carbone quaternaire coordonné au Pd est apparu à 151,0 ppm. Lorsque l'on compare les deux méthodes utilisées pour l'insertion du palladium pour la synthèse des complexes azotés **7a**, **7b** et **7c**, on constate que la transmétallation fonctionne

mieux que l'insertion C-H qui a donné peu ou pas de résultat. A l'inverse pour les complexes soufrés **7d** c'est l'insertion directe qui permet d'observer les meilleurs rendements.

Les composés **7-pb** et **7-pc** présentent des spectres de RMN ^1H plus compliqués. En effet, avec la création de deux nouveaux centres stéréogènes au niveau des azotes lors de la coordination du ligand **6** au palladium, il y a la possibilité d'avoir la formation de trois stéréoisomères uniques (S_N, S_N), (R_N, R_N) et (S_N, R_N).

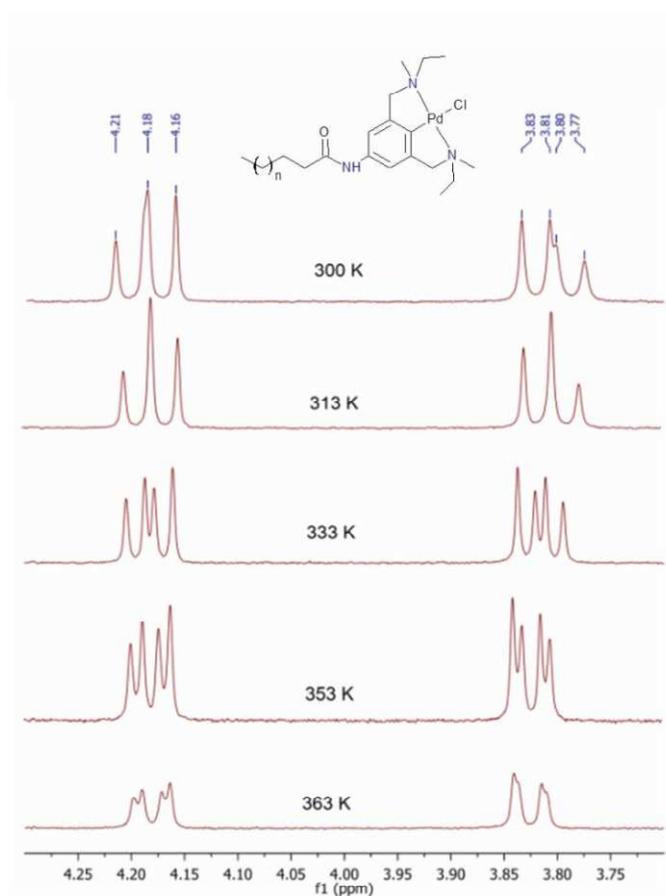


Figure 22 : Suivi RMN du complexe **7-pb** en fonction de la température.

Comme décrit plus tôt, il existe une certaine labilité au niveau de la liaison entre l'azote et le palladium. Une étude de RMN à température variable a été réalisée afin d'étudier l'échange possible entre les stéréoisomères. Pour cette expérience, nous avons sélectionné une gamme de température de 27 à 80 °C dans le DMSO- d_6 . Sur le spectre de RMN ^1H de **7-pb** à 300K (27°C), deux ensembles de signaux sont dédoublés : les quatre doublets pour les protons benzyliques, deux singulets pour les protons NCH_3 , quatre doublets pour les protons NCH_2CH_3 et deux triplets pour les protons NCH_2CH_3 sont observés, en accord avec la

présence d'isomères *Cis* et *Trans* par rapport au plan de coordination. Le spectre de RMN à température variable montre un élargissement des pics CH₂ benzylique et des NCH₂CH₃ en fonction de la température (Figure 22). À mesure que la température augmente, les pics de protons de la partie mobile s'élargissent, et les pics se rapprochent pour former des doublets élargis. Les protons les plus affectés sont ceux des deux groupes méthyle attachés aux bras azoté. Le complexe pince **7-pb** présente un comportement dynamique d'échange typique à deux sites. Nous suggérons que cette réaction intéressante d'échange de deux sites se déroule comme indiqué dans la Figure 23 suivante.

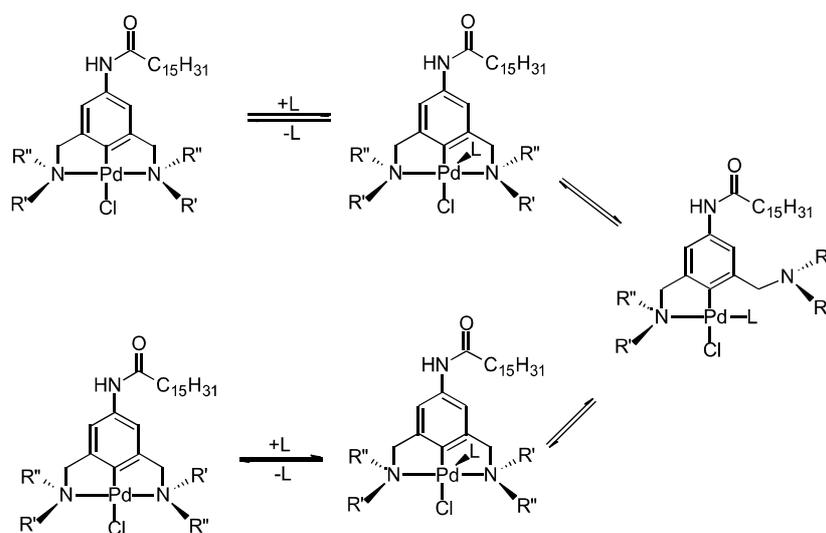


Figure 23 : Mécanisme d'interconversion conformationnelle.

Par la suite les complexes cationiques ont été synthétisés à partir des complexes NCN chlorés **7**. Pour ce faire, les complexes **7** sont mis à réagir avec AgOTf.²⁸ Après une heure à T.A. les complexes cationiques sont obtenus avec un rendement quantitatif. La réaction forme aussi des sels d'argent tel que AgCl, qui seront alors éliminés par filtration sur silice.

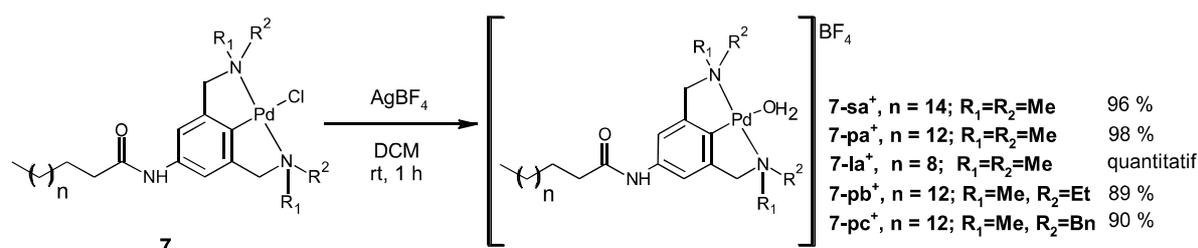


Schéma 19 : Formation du complexe cationique 7⁺.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C enregistrés après formation des complexes cationiques **7-pa⁺** montrent un ensemble de signaux qui indique la présence d'un seul diastéréoisomère en solution. Les déplacements chimiques des protons et des carbones sont assez semblables entre les composés **7-pa** et **7-pa⁺**, ce qui indique une disposition similaire du ligand à pinces NCN autour du palladium. La principale différence est cependant observée pour la résonance du C_{ipso} (voir la section expérimentale). Le déplacement chimique du C_{ipso} est plus déblindé dans **7-pa** par rapport à **7-pa⁺**, une différence de 5,8 ppm est observée entre les deux composés après aquation. Le déblindage du carbone dans **7-pa⁺** par rapport à **7-pa** reflète une combinaison de l'effet de leur interaction par liaison hydrogène avec le contre-anion. Pour le spectre ^1H , la différence se fait au niveau du proton NH qui est plus déblindé de 0,8 ppm dans le cas de **7-pa⁺** et des protons des groupes Me qui sont déblindés de 0,13 ppm ce qui est en accord avec les données de la littérature.²⁹

IV. Insertion dans la β -lactoglobuline.

1. Dichroïsme Circulaire (CD)

a. CD dans l'UV-proche

La première analyse réalisée pour vérifier l'insertion des ligands et des complexes dans la protéine est le dichroïsme circulaire (CD) dans le proche UV. La technique repose sur la capacité qu'ont les structures optiquement actives d'absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite de la lumière polarisée circulairement à gauche. L'insertion d'un chromophore dans la β -Lg peut induire un changement au niveau du spectre CD causé par la présence du chromophore dans l'environnement chiral de la protéine (effet extrinsèque) ou par perturbation de l'environnement des résidus aromatiques (effet intrinsèque).

Le spectre de dichroïsme circulaire de la β -Lg, dans le proche-UV, donne des informations sur la structure tertiaire de la protéine, en raison principalement des contraintes asymétriques de l'environnement des acides aminés. Pour la β -Lg native en milieu aqueux la zone étudiée va de 400 à 250 nm. Dans cette zone, le spectre CD en proche UV de la β -LG affiche un motif de deux bandes négatives attribuées à ses résidus aromatiques, la première bande à 293 nm et la deuxième à 285 nm³⁰. Ces deux pics sont dus majoritairement aux tryptophanes (Trp 19 et 61). La liaison d'un chromophore à la β -LG peut induire un changement du spectre CD

causé par l'effet extrinsèque. Lors de l'insertion du chromophore dans la protéine, le ligand va changer d'environnement et si celui-ci est assez fort, il devrait y avoir un transfert de chiralité et donc un changement possible dans le spectre CD.



Figure 24 : Association entre la protéine et le ligand par CD

Malheureusement, lors de premières mesures que nous avons effectuées et quelque soit les ligands, aucun changement n'est observé après ajout d'un équivalent de ligand dans une solution de β -Lg à pH = 7,5. Les spectres de CD des mélanges de β -Lg et des ligands (**6-la, 6-pa, 6-sa, 6-pb, 6-pc...**) sont identiques à celui de la β -Lg seule (Figure 25). La même expérience a été réalisée avec certains des complexes de Palladium (**7-la, 7-pa, 7-sa, 7-pb, 7-pc**) et malheureusement aucun changement significatif du spectre CD n'a été observé. Néanmoins, cela ne signifie pas que les ligands ou complexes ne s'insèrent pas dans la protéine. Mais seulement qu'aucun des deux effets cités précédemment ne semble être suffisamment prononcé pour induire un changement au niveau du spectre CD.

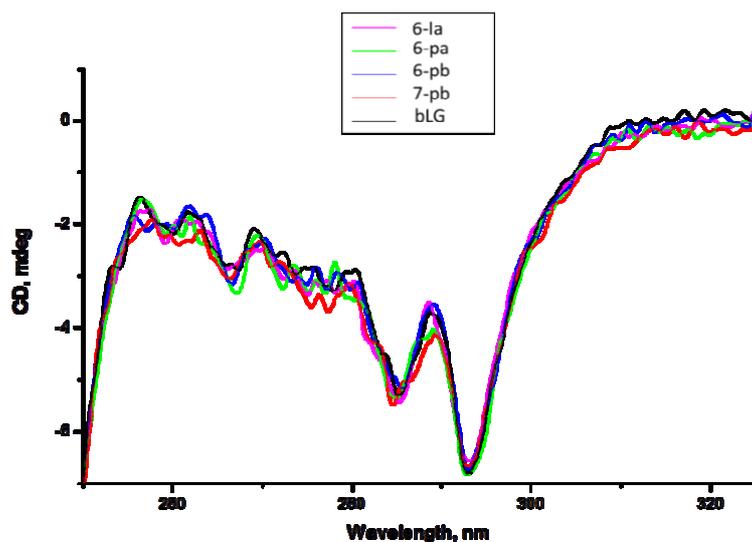


Figure 25 : Spectres CD des mélanges des ligands et complexes avec la protéine.

Par conséquent, une expérience de déplacement a été réalisée comme suit. Le spectre CD de la β -Lg est mesurée en premier puis le spectre CD d'un mélange stœchiométrique de β -Lg et de N, N-dipyridin-2-hexadécanamide (**Réf**) dont l'insertion dans la cavité de la β -Lg est connue et a été préalablement affirmée par spectroscopie CD.

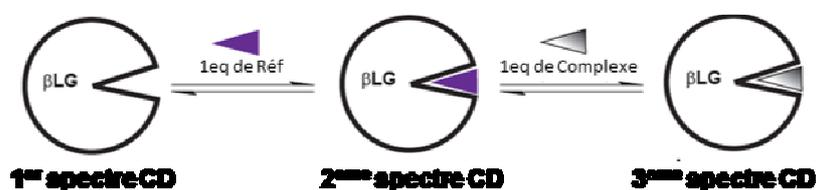


Figure 26 : Association entre la protéine et le ligand par déplacement du ligand de référence

Une large bande positive centrée à 270 nm est observée sur le spectre CD du mélange de β -Lg et **Réf**. Après addition d'une quantité stœchiométrique de **7-la**, **7-sa**, **7-pa**, **7-pb** et **7-pc**, l'intensité de la bande positive diminue de manière significative. Cela est dû au déplacement et remplacement partiel du ligand **Réf** par les complexes de palladium. En revanche, le spectre CD du mélange de β -Lg, **Réf** et **7-pc** est devenu très bruyant en raison de l'insolubilité du complexe dans le tampon. Ainsi, la spectroscopie CD proche de l'UV a fourni une preuve indirecte et qualitative de la capacité des complexes **7-la**, **7-sa**, **7-pa** et **7-pb** à se lier à la β -Lg par insertion probable dans la poche de liaison hydrophobe de la protéine (Figure 27), tandis

que le complexe **7-pc**, semble avoir plus de difficulté à s'insérer dans la protéine en raison de l'encombrement stérique amené par les deux groupes benzyles.

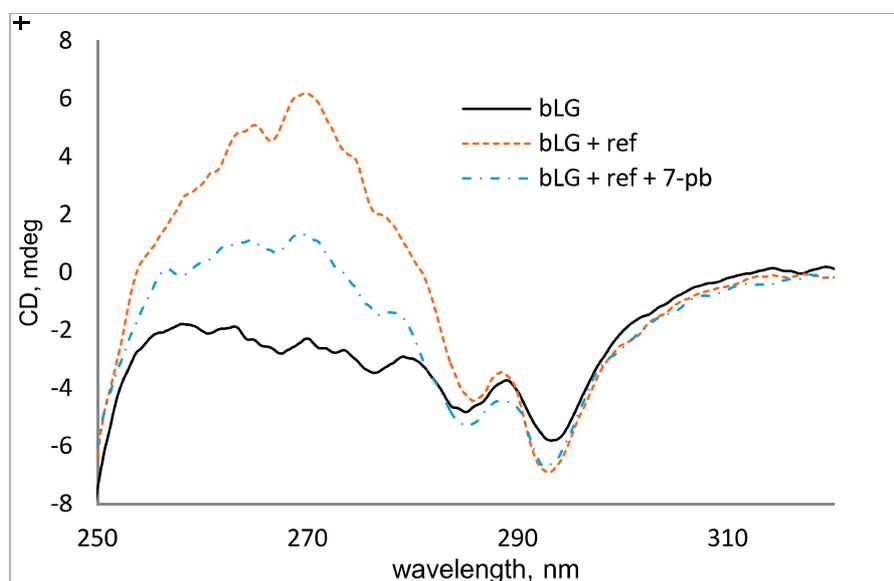


Figure 27 : Spectres CD de la β -Lg, du mélange de β -Lg + Réf et du mélange β -Lg + Réf + 7-pb.

Toujours en réalisant une expérience de déplacement, nous avons voulu connaître l'influence du nombre d'équivalents de complexe **7** ajoutés sur la réponse du spectre CD. Pour cela, le spectre de la solution de β -Lg avec un équivalent de **Réf** est comparé aux solutions après ajout de 2, 3 et 4 équivalents de complexe **7-la**. Nous constatons que plus on ajoute de complexe **7-la** au mélange (β -Lg + **Réf**) plus le spectre CD se rapproche de la courbe observée sans **Réf** (Voir Figure 28). Plus le nombre d'équivalent de complexe **7** est ajouté au mélange **Réf** et β -Lg, plus l'équilibre entre β -Lg \subset **7** et β -Lg \subset **Réf** va être déplacé en faveur de l'insertion du complexe **7**. Comme attendu, le nombre d'équivalent ajouté a donc une influence significative sur l'entrée de la molécule dans la protéine. La nécessité de 4 équivalents de complexe **7-la** pour se rapprocher du spectre initial peut être due à une différence d'affinité entre **7-la** et **Réf** vis-à-vis de la protéine. En effet, il est possible que **Réf** ait une meilleure affinité avec la protéine que **7-la**. Il faut donc plus d'équivalents de complexe **7-la** pour déplacer totalement **Réf** au sein de la β -Lg.

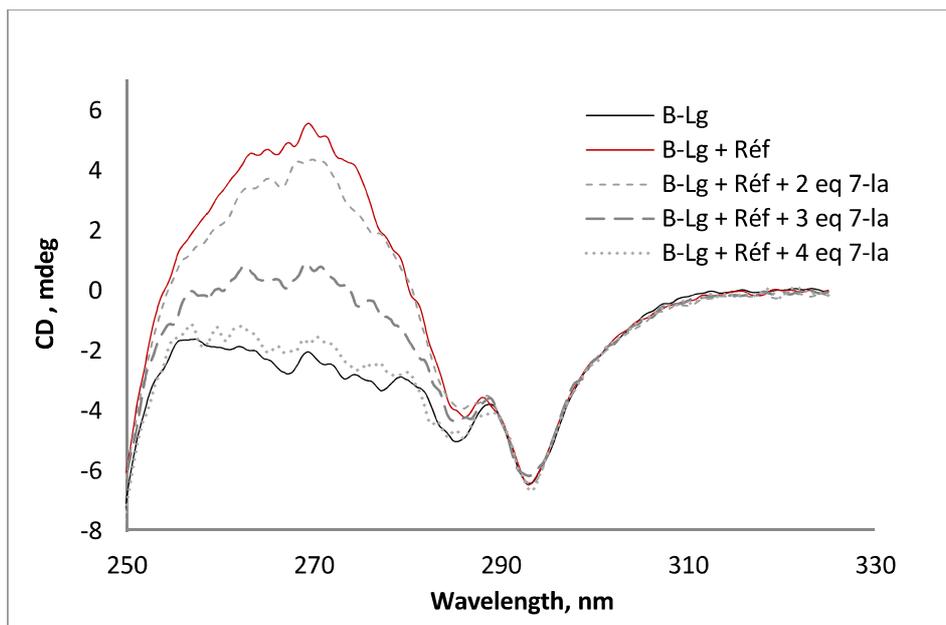


Figure 28 : Spectres CD par déplacement en fonction du nombre d'équivalent de 7-la.

Enfin, le spectre CD en proche UV des mélanges de β -Lg et des complexes cationiques **7-pa⁺**, **7-pb⁺** et **7-pc⁺** a aussi été mesuré. Après l'ajout d'une quantité stœchiométrique de ces complexes à la β -Lg, la disparition des deux pics à 285 et 293 nm est observée (Figure 29). Cette modification est observée pour chacun des complexes et la disparition des pics Trp semble montrer l'insertion des complexes **7⁺** dans la β -Lg. Néanmoins la disparition de ces bandes peut aussi avoir un aspect négatif. En effet, cette disparition peut être l'indication que l'environnement des résidus dans la β -Lg devient moins contraint que dans la protéine native. Il serait alors possible que la protéine ait subi un changement de conformation. Ce phénomène a notamment déjà été observé dans le cas d'ajout de molécule dénaturante tel que le chlorure de dodecyltriméthylammonium (DTAC). En effet, la diminution des pics des Trp jusqu'à leur disparition a été observé avec l'augmentation progressive de la concentration de DTAC.³¹

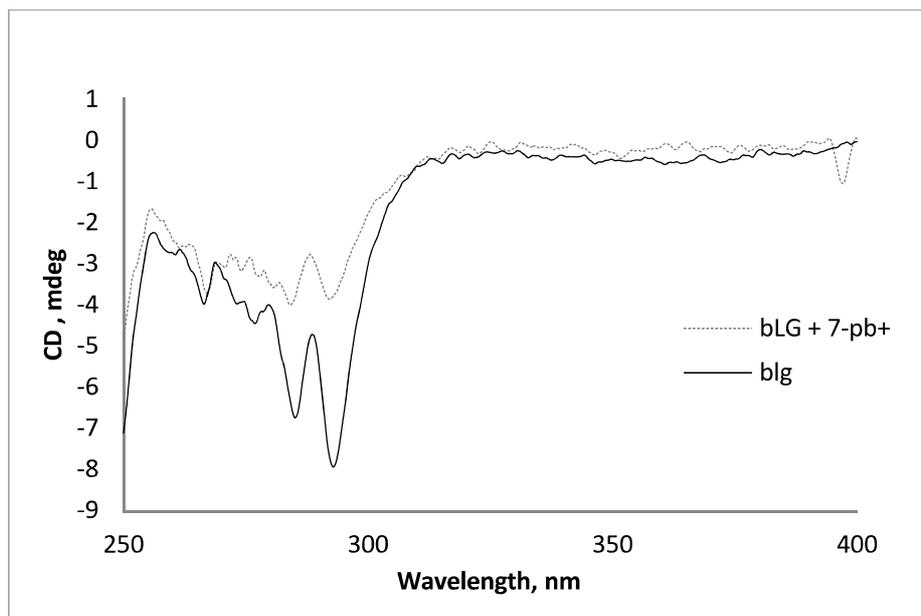


Figure 29: Spectre CD du mélange de β -Lg et du complexe cationique 7-pb⁺.

b. CD dans l'UV- lointain

Afin de vérifier l'hypothèse du changement de conformation de la protéine, dans le cas des complexes cationiques **7-pa⁺**, **7-pb⁺** ou **7-pc⁺**, le spectre de CD dans l'UV-lointain a été mesuré. Le spectre CD dans l'UV- lointain caractérise la structure secondaire des protéines, celle-ci est due à l'absorbance des liaisons peptidiques, l'ellipticité moléculaire à 222 et 208 nm est habituellement utilisée pour caractériser les hélices α .³⁰ Si un changement dans cette zone du spectre CD avait été observé une dénaturation de la β -Lg aurait été confirmée. Le spectre de CD lointain de β -Lg montre une large bande négative centrée autour de 215 nm typique des protéines à cavité en β -barrel. L'addition d'une quantité stoechiométrique de **7-pa⁺**, **7-pb⁺** ou **7-pc⁺** à la solution de protéine n'induit aucun changement du spectre, ce qui indique que la structure secondaire a été maintenue lors de la liaison de **7-pa⁺** et **7-pb⁺**. Cela montre que dans le cas de ces complexes ce n'est pas un changement de conformation ni la dénaturation du β -barrel qui provoque la disparition de pics Trp. Ceci est seulement dû à un changement possible de la structure tertiaire au voisinage des Trp et résulterait donc de l'insertion de nos complexes **7⁺** dans la β -Lg.

2. Modélisation

Ces dernières années, des approches computationnelles ont été utilisées pour optimiser la formation d'assemblage ligand-protéine en réalisant des changements structuraux et énergétiques. Ces informations ont été utilisées comme base afin d'améliorer l'affinité des ligands pour leurs protéines cibles.

Des analyses de docking ont déjà été faites pour étudier la capacité de différents composés à s'insérer dans la β -Lg. Ainsi l'équipe de Baldini a rapporté le docking de différents acides gras dans la β -Lg. En effet dans ces travaux trois solutions différentes ont été générées par GRID, et ont donné des estimations des énergies de liaison pour l'acide palmitique (-14,8 Kcal / mol), ainsi que pour l'acide laurique (-11,9 Kcal / mol), qui souligne une affinité plus faible pour cet acide gras plus court.³²

Les études de docking de nos complexes ont été réalisées en collaboration avec l'équipe d'Ilaria Ciofini, à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris et par Giuseppe Mangiatordi de l'université de Bari. Le logiciel Glive a permis de réaliser le docking de l'ensemble des complexes de palladium fonctionnalisés avec la chaîne palmitique.

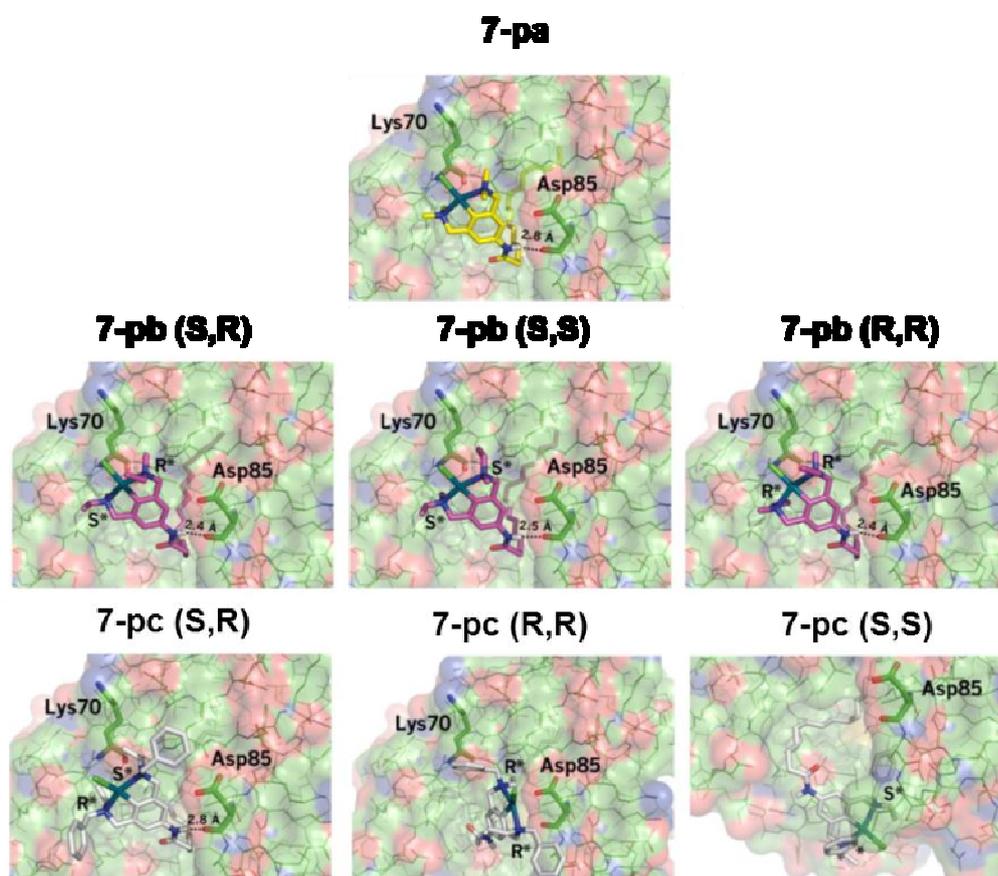


Figure 30 : Meilleures poses des complexes 7 par modélisation

Les meilleures poses obtenues pour les composés **7-pa**, **7-pb** et **7-pc** sont représentées sur la Figure 30. Comme mentionné ci-dessus, ces composés sont caractérisés par une chaîne aliphatique de 15 atomes de carbone, une "tête" organométallique avec le métal et sa sphère de coordination, et un groupe amide reliant la chaîne aliphatique à la tête organométallique. De façon gratifiante, toutes les poses montrent comme prévu la chaîne aliphatique à l'intérieur de la poche de la protéine (le β -barrel) donneuse de liaisons hydrophobes. En outre, **7-pa** ainsi que tous les diastéréoisomères de **7-pb** établissent une interaction par liaison hydrogène avec un acide aminé de la β -Lg, l'Asp85. De telles interactions impliquent l'atome d'azote du groupe amide du complexe avec un oxygène de l'Asp. Néanmoins en regardant les complexes **7-pa** et **7-pb**, on observe que ceux-ci sortent un peu et sont penchés sur la protéine et semblent avoir une face libre et une face contre la protéine. (Voir Figure 31).

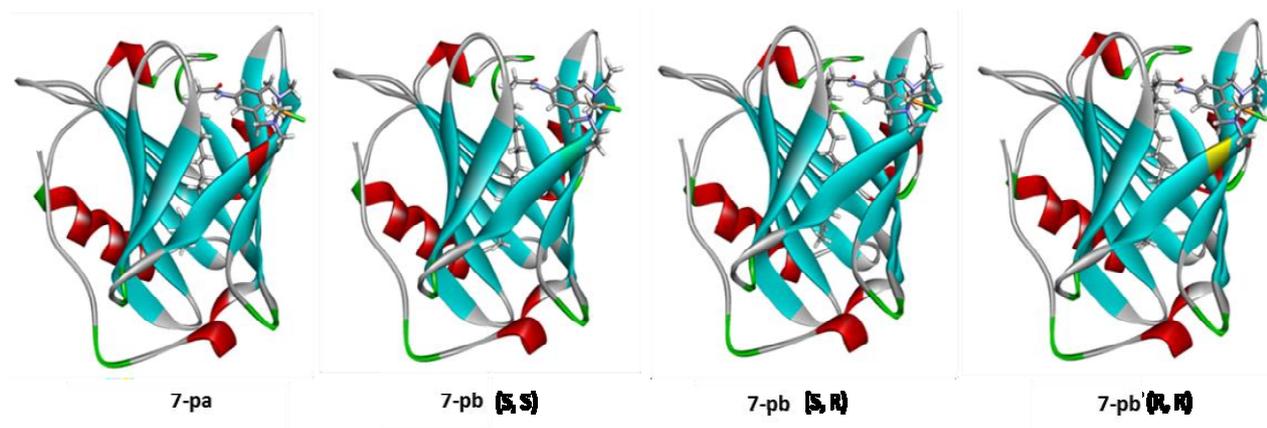


Figure 31 : Docking des complexes **7-pa** et **7-pb** dans la β -Lg.

En ce qui concerne **7-pc**, le seul diastéréoisomère établissant une liaison H avec la protéine est **7-pc** (S, R) alors qu'aucune liaison H ne peut être détectée dans les poses de **7-pc** (R, R) et **7-pc** (S, S). Cette absence de liaison hydrogène offre une explication possible à l'incapacité de **7-pc** à se lier à la protéine. Ces observations se trouvent être en accord avec les résultats spectroscopiques CD en proche-UV. En effet, on peut spéculer que la présence de substituants volumineux sur la tête métallique empêche la formation d'une liaison H entre le ligand et la protéine en interdisant une orientation spécifique du groupe amide. Comme on l'a déjà mentionné, la pose d'ancrage est liée à la conformation privilégiée adoptée pour la liaison, alors que le score représente une estimation énergétique de la force des interactions établies, basée sur l'application d'équations simples.

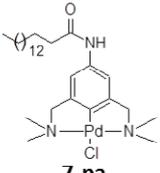
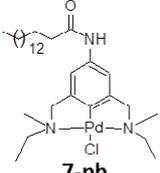
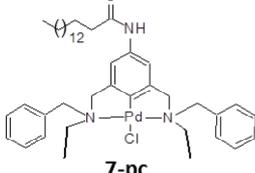
catalyseur	R,S	S,S	R,R
 7-pa		-8,16	
 7-pb	-8,57	-8,33	-8,44
 7-pc	-8,10	-7,65	-7,80

Figure 32 : Scores de docking des complexes 7-pa, 7-pb et 7-pc (en Kcal/mol).

Cependant, la principale limite des méthodes de docking est l'estimation de l'énergie de liaison, la somme des termes est utilisée de telle sorte qu'une dépendance notable entre la taille du ligand et son score soit observée. Etant des molécules assez grosses, elles sont potentiellement capables d'établir plus d'interactions, y compris des interactions hydrophobes. Sur la base de ces données, les scores pour les conformations de liaison prédites avec précision ne peuvent pas être utilisés pour classer les composés se liant à la même protéine mais ayant des tailles différentes. A cet égard, il est important de remarquer que le plus gros des ligands, **7-pc** donne les plus bas scores d'ancrage quel que soit le stéréoisomère considéré, (-8,10 kcal / mole pour **7-pc** (S, R), -7,80 kcal / mole pour **7-pc** (R, R) et -7,65 kcal / mol pour **7-pc** (S, S)) comparé à **7-pa** (-8,16 kcal / mole) et **7-pb** (-8,57 kcal / mole pour **7-pb** (S,R), -8,44 kcal / mol pour **7-pb** (R, R) et -8,33 kcal / mol pour **7-pb** (S, S)). En d'autres termes, la pose et la notation indiqueraient que la liaison de **7-pc** à la β -Lg est moins favorable que pour **7-pa** et **7-pb**. Néanmoins lorsque l'on regarde les variations d'énergie des scores de docking des différents stéréoisomères d'un même complexe, on peut voir que celle-ci est faible. Il semble que pour les complexes **7-pb**, il n'y ait pas de stéréoisomère favorisé après insertion dans la protéine. De même pour les stéréoisomères de **7-pc** aucun ne semblent être favorisé. De plus dans deux des représentations, le complexe ne présente pas de liaison hydrogène ce qui nous laisse penser que ce complexe sera encore moins susceptible d'être influencé par la protéine. Pour ces trois complexes **7-pa**, **7-pb** et **7-pc** il semble que seule la seconde sphère de

coordination par la protéine sera responsable de l'induction de chiralité lors de la réaction de catalyse.

Il est intéressant de noter que les têtes métalliques de tous les ligands considérés n'établissent pas d'interaction forte avec les résidus protéiques, suggérant ainsi la présence de différentes conformations après la formation du complexe protéine-ligand. Ceci est en plein accord avec la carte de densité électronique dérivée de la diffraction des rayons X d'un complexe métallique similaire lié à β -LG (code PDB 4KII).³³

Cependant, l'inspection visuelle des poses obtenues indique la présence de résidus polaires et chargés à l'entrée du site de liaison des acides gras, qui sont potentiellement capables d'établir de fortes interactions par liaison H. Ceux-ci peuvent interagir avec des accepteurs de liaison H ou des donneurs portés par la tête organométallique. Des exemples sont représentés par la chaîne latérale d'Asp85 et de Lys70, toutes deux très proches de la tête organométallique de la pose de notation supérieure de **7-pa**. Sur la base de ces observations, il a été criblé une large banque virtuelle de complexes à pince de palladium avec différents accepteurs de liaisons H et donneurs liés à la tête organométallique. A partir de cette étude *in silico*, on a prédit que le composé **7-pe** présenterait une affinité plus grande pour l'hôte protéique grâce à des liaisons hydrogène supplémentaires. Ceci est évident dans la Figure 33 où les meilleures poses de tous les diastéréoisomères de **7-pe** sont représentées. En effet, la présence de groupes hydroxyéthyle liés à la tête organométallique permet d'établir des liaisons H avec les chaînes latérales d'Asp85 (tous les diastéroisomères **7-pe**) et Lys70 (**7-pe** (S, S) et **7-pe** (R, R)).

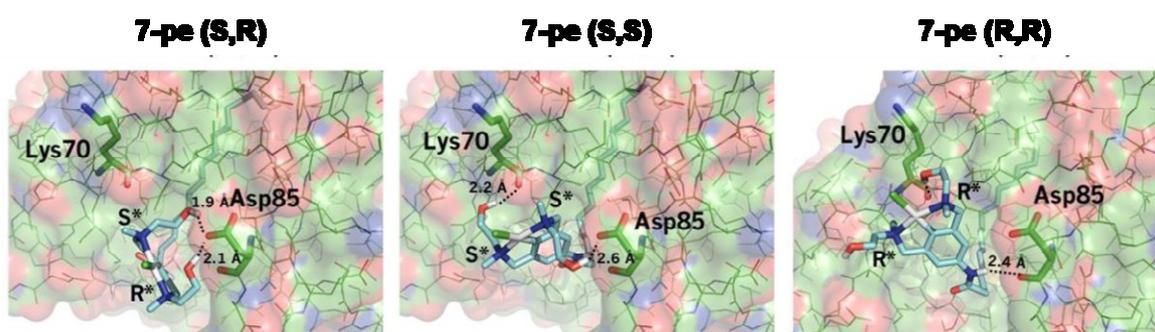


Figure 33 : Meilleures poses des complexes 7-pe par modélisation

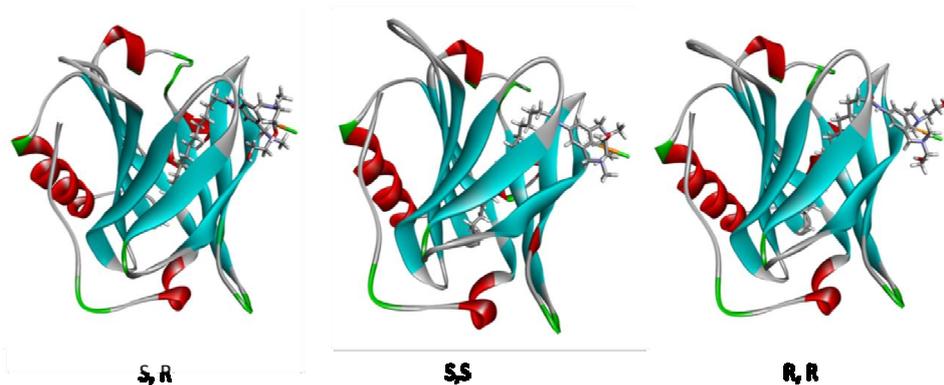


Figure 34 : Docking des complexes 7-pe dans la β -Lg.

L'importance de telles interactions est à nouveau étayée par les scores d'ancrage obtenus. En effet, **7-pe** (S, R), **7-pe** (S, S) et **7-pe** (R, R) fournissent de meilleurs scores de docking par rapport à tous les autres composés étudiés, soit -10,20 kcal / mol, -9,60 kcal / mol et -8,80 kcal / mol respectivement (Figure 35). Le dérivé stéarique **7-se** a aussi été étudié en docking, la présence de groupes hydroxyéthyle liés à la tête organométallique permet d'établir de fortes interactions de liaison H avec les chaînes latérales de Glu74 et Ile 72 (pour tous les diastérisomères **7-se**). Ces résultats donnent des scores de docking plus faibles que pour la chaîne palmitique. Il semble donc que la meilleure association avec la protéine se fasse avec le complexe **7-pe**, ce qui n'a rien d'étonnant car l'acide palmitique est lui aussi connu pour avoir une meilleure affinité que les autres acides gras.³⁴ Cependant même si les écarts entre les différents scores de docking des stéréoisomères sont supérieurs à ceux obtenus précédemment ils ne sont pas suffisants pour affirmer qu'un stéréoisomère sera favorisé par rapport aux autres, une fois inséré dans la protéine. Il n'est donc pas possible d'affirmer qu'un hybride de β -Lg \subset **7** sera privilégié par rapport aux autres.

	S, R	R, R	S, S
7-se , n= 14	-8,4	-9,02	-7,8
7-pe , n=12	-10,2	-8,8	-9,6

Figure 35 : Scores de docking des complexes 7-se et 7-pe (en Kcal/mol).

V. Synthèse des complexes 7e

Après les calculs de docking, nous nous sommes intéressés à la synthèse des complexes **7e** capables de réaliser des liaisons hydrogènes supplémentaires avec la β -Lg. Le criblage in silico a permis d'identifier les complexes **7-le**, **7-pe** et **7-se** comme une bonne alternative pour ajouter de nouveaux groupements hydroxy capables de réaliser des liaisons hydrogènes supplémentaires, sans changer la synthèse précédemment établie.

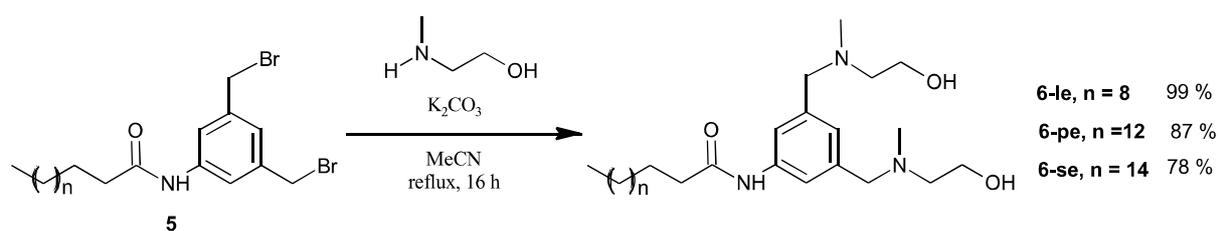


Schéma 20 : Synthèse des ligands de la série 6e par substitution nucléophile.

Ainsi de la même manière que les complexes précédemment développés, les ligands **6e** sont obtenus par substitution nucléophile des bromes du composé **5** par le 2-méthyl aminoéthanol ce qui permet de produire les ligands **6e** avec un rendement allant de 78 à 99 %.

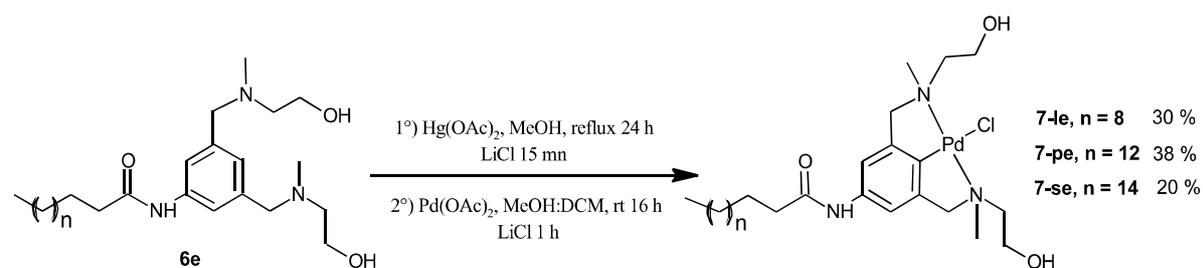


Schéma 21: Synthèse des complexes de la série 7e par transmétallation

Les ligands **6e** sont par la suite complexés au palladium en suivant la même activation par transmétallation que pour les complexes **7a**, **7b** et **7c**. Cependant dans le cas des complexes **7e**, l'analyse RMN semble montrer un seul diastéréoisomère. Cette particularité semble être due à la présence des fonctions hydroxy qui peuvent venir complexer le palladium.

Néanmoins en RMN ^1H , des protons inéquivalents³⁵ sont observés notamment au niveau des CH_2 benzyliques, et des CH_2 de l'aminoéthanol. Cette diastéréotopie a été mise en évidence,

en RMN, grâce aux expériences COSY et HSQC. Avec la HSQC, il a été montré que pour deux signaux différents en RMN du proton un seul carbone était corrélé (Figure 36).

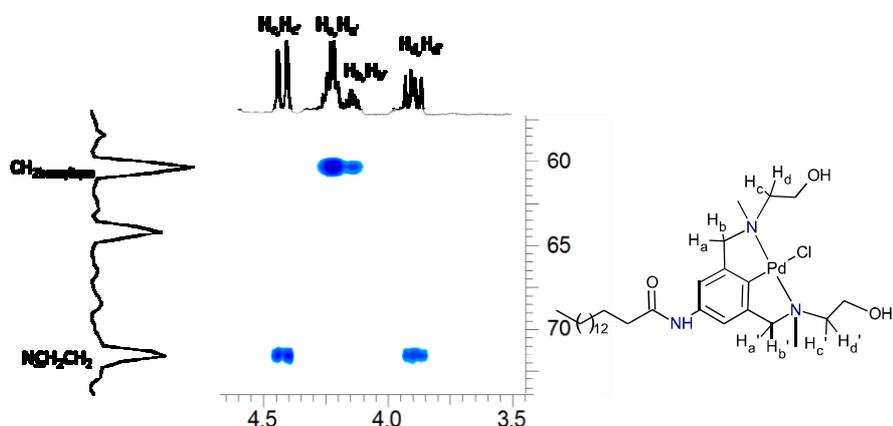


Figure 36 : Spectre HSQC de 7-pe montrant les protons diastéréotopes

Par l'expérience COSY, il a été montré que les deux protons portés sur un même carbone sont dédoublés en RMN ^1H et couplent entre eux et avec les autres protons voisins. Ce type de situation peut naitre d'une différence d'environnement chimique des deux protons ou de la présence d'un centre stéréogène à proximité du groupe méthylène peut aussi provoquer une non équivalence des protons méthylène engendrant ainsi le phénomène de diastéréotopie. L'observation la plus significative pour ce système est l'étendue de la diastéréotopie ($\Delta\delta = \delta\text{H}_c - \delta\text{H}_d$), qui est égal à 0,51 ppm pour les protons NCH_2CH_2 proches de l'azote. De la même manière, les CH_2 benzyliques et les NCH_2CH_2 ont eux aussi un $\Delta\delta$ mais moins important que le premier ($\Delta\delta = 0,06$ ppm et 0,31 ppm respectivement). On peut noter que ce sont toujours les mêmes motifs qui sont retrouvés sur les spectres RMN ^1H pour les protons des CH_2 benzyliques et des CH_2 de l'aminoethanol des composés **7-le**, **7-pe** et **7-se**. Ceci semble indiquer que les différences au niveau de la longueur de la chaîne n'influencent pas la résonance des protons des molécules. Cependant la diastéréotopie semble être symétrique car le deux $\text{CH}_2(\text{OH})$ de la molécule possède le même déplacement en RMN ^1H et ^{13}C .

VI. Etude d'insertion dans la β -Lg.

1. Etude par CD

L'association des complexes **7e** à la β -Lg a ensuite été étudiée par de nouvelles expériences de dichroïsme circulaire dans le proche UV suivant la même procédure que pour les ligands et les complexes précédents. Le spectre de la β -Lg seule est mesuré puis une quantité équivalente de ligand **6e** est ajouté, mais comme dans les cas précédents aucun changement n'est observé par rapport au spectre CD de la β -Lg. Cependant, les solutions sont troubles ce qui laisse supposer que les ligands ne s'insèrent pas dans la protéine. La liberté de mouvements des groupements aminoéthanol peuvent être une des raisons pour laquelle ces molécules ont du mal à s'insérer. Avec la formation des complexes, il est possible d'espérer une rigidification de la structure qui permettrait alors l'entrée des composés **7e** dans la protéine. Ainsi les spectres de dichroïsme ont été mesurés après ajout d'un équivalent des complexes. Un changement significatif du spectre CD a été noté lors de l'addition d'une quantité stoechiométrique de **7-se** et **7-pe**, avec une augmentation du signal CD autour de 260 nm ainsi qu'une diminution de l'intensité absolue des deux bandes à 285 et 293 nm attribuées aux deux résidus Trp de la β -Lg (Figure 37). Après avoir fait un spectre UV d'absorbance de ces trois complexes, il est constaté que la zone d'absorption des complexes correspond bien à la même que celle où le spectre CD change. Le signal CD positif induit est probablement dû à la liaison des deux complexes à β -Lg et au positionnement du chromophore dans l'environnement chiral de la protéine. Il semble que dans le cas des complexes **7e** les liaisons hydrogène identifiées par calcul entre la protéine et les complexes permettent bien cette fois d'avoir un effet intrinsèque visible dû à un changement de l'environnement du chromophore.

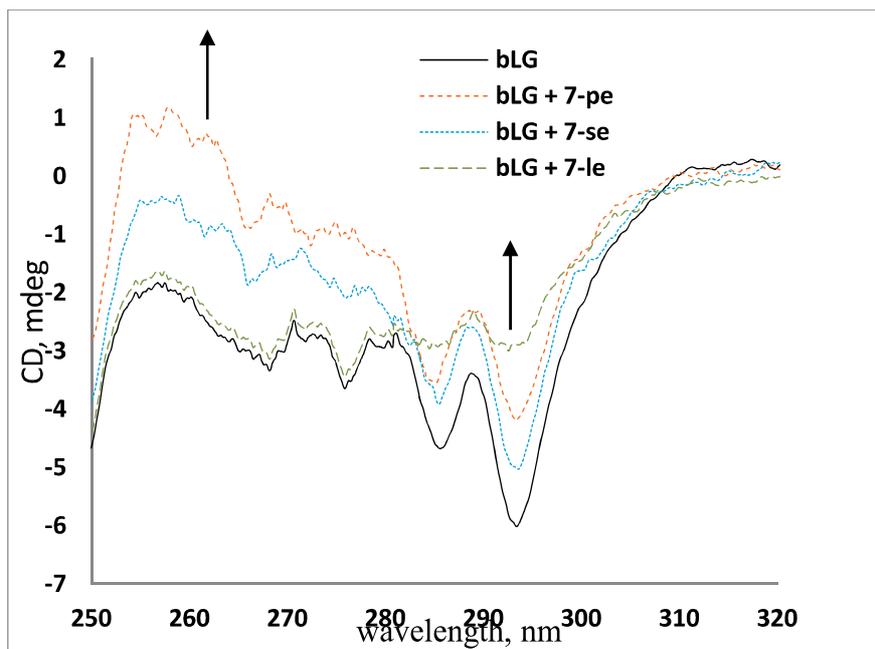


Figure 37 : Spectres CD des mélanges de β -Lg et des complexes de la série 7e.

En revanche, l'addition de **7-le** à la solution de β -Lg a entraîné la disparition presque complète des deux bandes négatives à 285 et 293 nm, ce qui indique que l'environnement anisotrope des résidus de tryptophane a été perturbé par la présence de **7-le**. La disparition de ces pics peut avoir aussi comme raison une dénaturation de la protéine. Afin de vérifier qu'aucune dénaturation ne s'est produite, le spectre CD lointain du mélange de β -Lg et **7-le** est mesuré. Comme celui-ci était superposable à celui de β -Lg seule, la liaison de **7-le** n'a pas affecté la structure secondaire des feuillets bêta de la β -Lg. La disparition des pics des tryptophanes est donc le résultat de l'association du complexe **7-le** dans la protéine (effet intrinsèque).

2. Fluorescence

Un grand nombre d'études rapporte le changement de fluorescence intrinsèque des tryptophanes de la β -Lg avec différents composés.^{32 36 37} Au sens large, le quench de la fluorescence désigne tous les processus qui entraînent une diminution de l'intensité de fluorescence d'un fluorophore. Une variété d'interactions moléculaires peut entraîner le quench, comme les réarrangements moléculaires, le transfert d'énergie et le quench collisionnel.

La fluorescence est la technique qui a été utilisée dans beaucoup de recherches pour étudier la liaison des protéines avec des ligands comme les polyphénols, les tensioactifs, etc., en raison

de leur facilité d'accès et de précision. La tyrosine (Tyr), le Tryptophane, phénylalanine (Phe) sont responsables de la fluorescence intrinsèque des protéines. La β -Lg contient quant à elle deux Trp et quatre Tyr. Par conséquent, il est possible d'utiliser le quench intrinsèque des Trp et des Tyr dans la β -Lg en tant qu'outil pour étudier l'interaction avec la β -Lg. La complexation d'acides gras saturés et insaturés non fluorescents avec la β -Lg a été démontrée par spectroscopie de fluorescence de ses deux résidus Trp19 et Trp61, Le premier est situé au fond du calice alors que le deuxième est situé sur une boucle externe et est accessible aux solvants. Les études comparatives de la β -Lg où il manque le Trp61, ont montré que dans un environnement hydrophobe le Trp19 contribue à plus de 70% de l'émission totale.³⁸ Dans la littérature, les changements de la fluorescence de la β -Lg induits par ces ligands sont dus au transfert d'énergie résonnant (RET) entre la partie indole excitée des tryptophanes et du ligand, ou par des changements de polarité dans le voisinage des résidus de tryptophane voire les deux effets. Mais étant donné qu'il existe un chevauchement partiel entre le spectre d'émission de fluorescence de la β -Lg et les spectres d'absorption de nos complexes, le quench par RET est susceptible de se produire avec les complexes agissant comme accepteurs. Ce phénomène est très courant et a été observé dans le cas de l'insertion du rétinol ou de la β -ionone dans la β -Lg. En effet la présence de rétinol induit un quench significatif de la fluorescence de la β -Lg. En comparaison, l'addition de rétinol au tryptophane libre a induit relativement peu de quench de fluorescence du tryptophane libre. Ceci indique que le quench de la fluorescence de la β -lactoglobuline par le rétinol est largement due à la liaison du rétinol à la protéine.³⁹

Nous avons alors décidé d'appliquer le titrage de fluorescence pour étudier l'assemblage des complexes métalliques **7e** à la β -Lg et déterminer éventuellement la constante de liaison. La liaison des complexes a été évaluée en suivant le quench de la fluorescence de la protéine, avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission fixées respectivement à 296 nm et 335 nm.

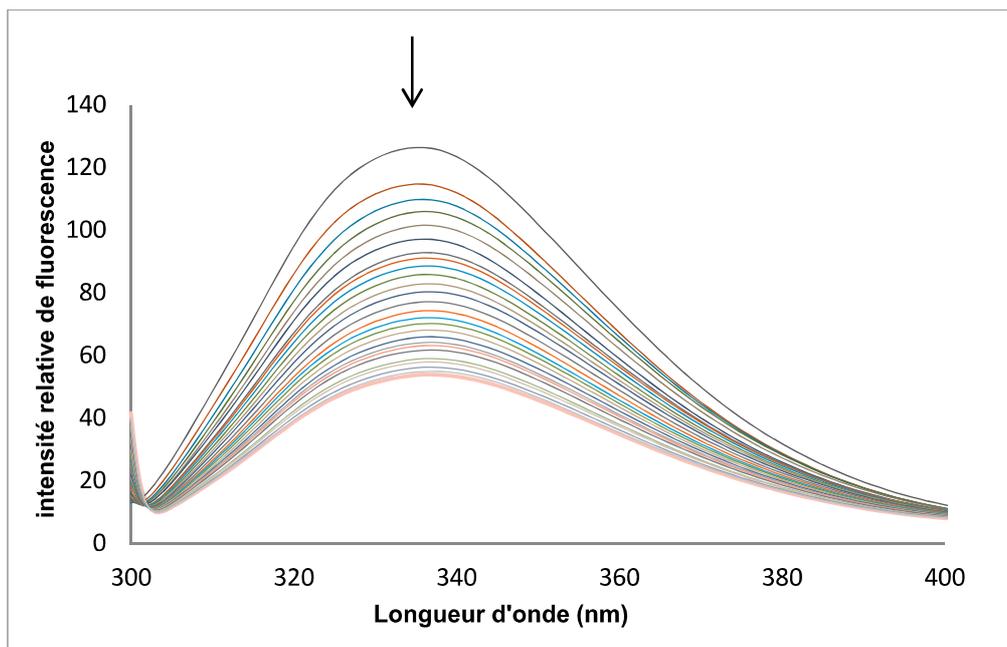


Figure 38 : Fluorescence de la β -Lg en présence du complexe de palladium 7-pe

Le maximum d'émission de la β -Lg (335 nm) est déplacé de 20 nm vers le bleu par rapport au tryptophane libre (356 nm). Ce phénomène est dû au résidu tryptophane Trp 19 qui se trouve être dans un environnement apolaire au sein de la protéine. Pour l'expérience de fluorescence, un ajout progressif de 0,1 équivalent de complexe à une solution de β -Lg dans du tampon phosphate à pH = 7,5 est réalisé. Après chaque addition de complexe, le système a été laissé sous agitation pendant 15 mn afin de permettre au mélange de s'équilibrer avant l'enregistrement du spectre de fluorescence. L'addition suivante de complexe n'a été effectuée qu'après stabilisation du signal de fluorescence de l'addition précédente (Figure 38).

Cette expérience montre l'effet des complexes **7-pe** et **7-se** sur le spectre de fluorescence de β -Lg. Contrairement à l'acide palmitique et à d'autres acides gras qui induisent une augmentation de la fluorescence, l'addition de complexes à la β -Lg entraîne une forte extinction de la fluorescence intrinsèque de la protéine. On peut voir que la position du pic maximal de la β -Lg était proche de 335 nm et la valeur intrinsèque d'intensité de fluorescence de β -Lg diminue en présence d'une concentration croissante de complexe. On a constaté que l'intensité de la fluorescence de β -Lg a diminué de 50% pour **7-pe** et 80 % pour **7-se**. Ces résultats impliquent que ces complexes de palladium peuvent se lier avec la β -Lg. À la fin des différents titrages, la concentration de DMSO était égale à 2% , elle est donc supposée n'avoir aucun effet sur le système. De plus, dans toute la gamme des concentrations étudiées, les solutions sont demeurées claires sans turbidité détectable. Pour l'expérience de contrôle, une

solution de N-acétyl-L-tryptophanamide (NATAL) ayant une absorbance à 296 nm égale à celle de la protéine a été utilisée. Ce composé possède une fluorescence semblable à celle de la protéine, mais il ne doit pas interagir avec les complexes **7-pe** et **7-se**. Les complexes ont été ajoutés à cette solution exactement de la même manière que la solution de protéine et l'intensité de fluorescence enregistrée (Figure 39). Cette expérience montre un très faible quench de la fluorescence due à l'effet de filtre interne. Cette décroissance est due à l'absorbance du chromophore dans la région de l'excitation. Avec cette expérience il est possible d'éliminer le quench de la fluorescence qui n'est donc pas dû à l'insertion du complexe dans la protéine.

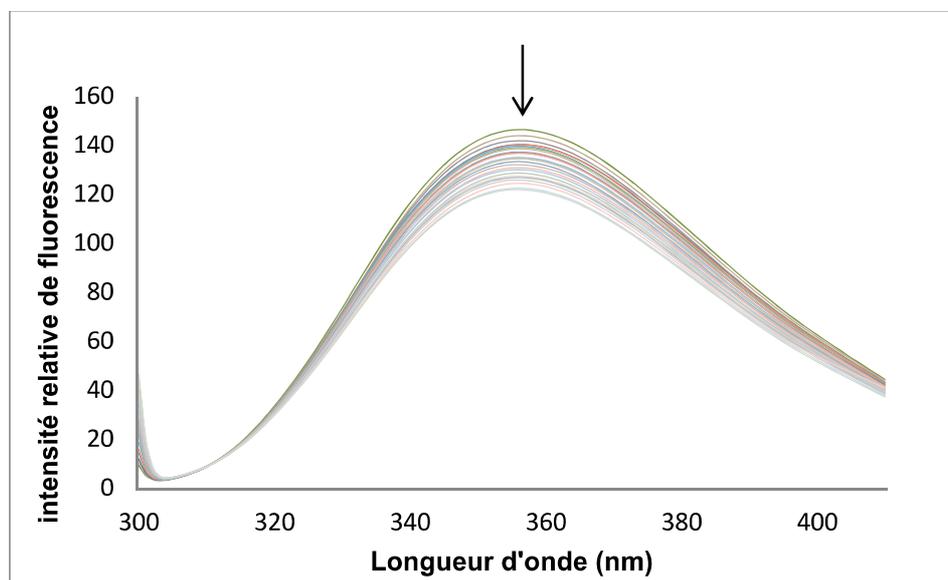


Figure 39 : Fluorescence du NATAL en présence du complexe de palladium 7-pe.

Une fois ces deux expériences de fluorescence réalisées les valeurs d'intensité obtenues sont tracées en fonction de la concentration de complexe. Grâce à ces données une correction est réalisée sur la fluorescence de la β -Lg en soustrayant la fluorescence observée avec le NATAL. Dans le cas du complexe palmitique **7-se** une forte diminution jusqu'à deux équivalents est observée. Ensuite la fluorescence se stabilise pour tendre vers une fluorescence maximale donnant une diminution de fluorescence de 35% après correction (Figure 40).

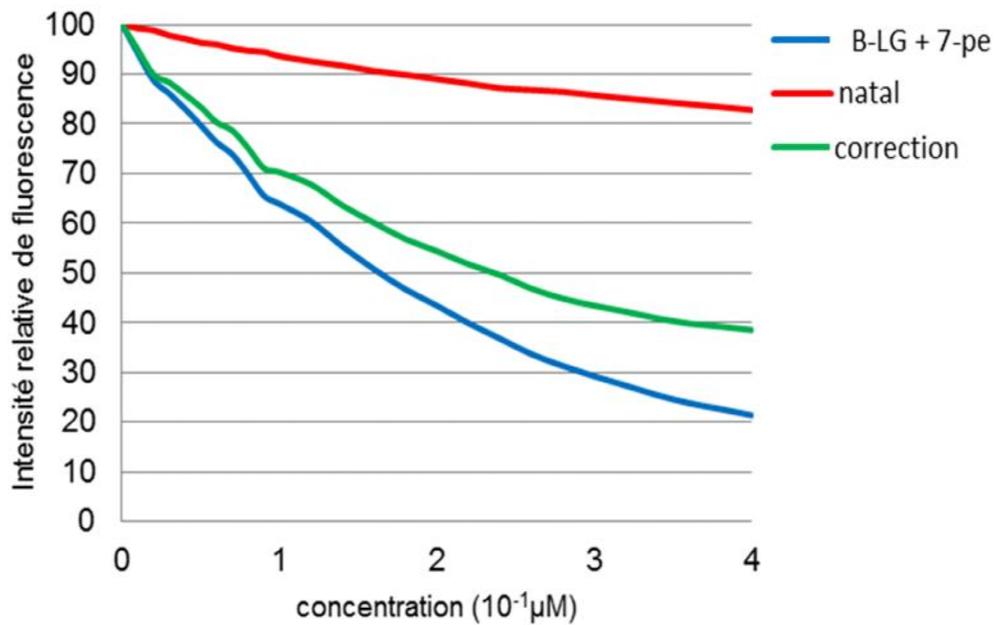


Figure 40 : Fluorescence de la β -Lg et de NATAL en présence de 7-pe

Dans le cas du complexe stéarique **7-pe** une forte diminution jusqu'à trois équivalents est observée. Ensuite la fluorescence stabilise très légèrement pour tendre vers une fluorescence maximale donnant une diminution de fluorescence de 62% après correction (Figure 41).

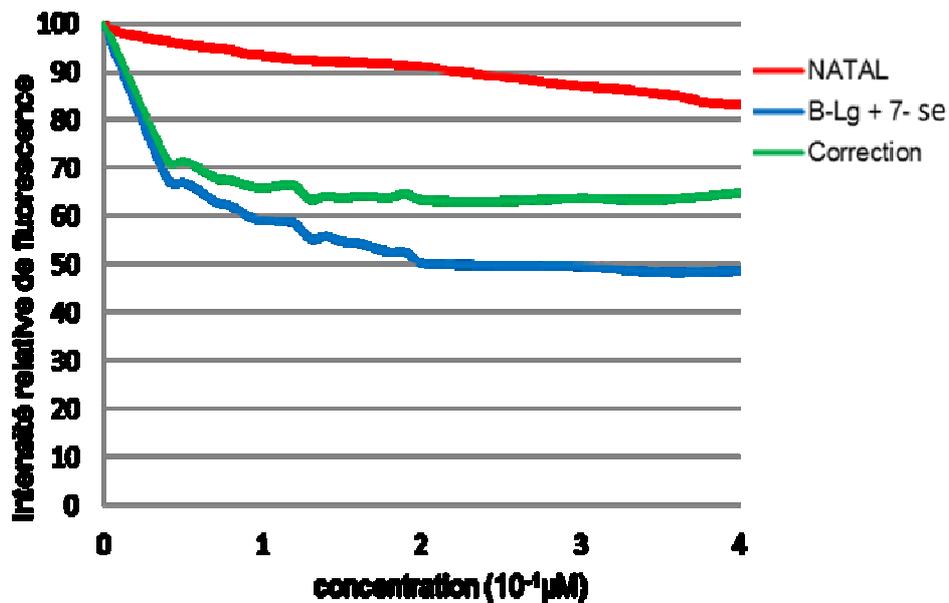


Figure 41 : Fluorescence de la β -Lg et de NATAL en présence de 7-se

Les constantes de dissociation apparentes K_d et les rapports de liaison «n» ont pu être ensuite déduits des données de fluorescence selon Cogan et al.⁴⁰ en utilisant l'équation (1). Avec P_0 représentant la concentration totale de protéine, R la concentration de complexe **7-pe** et **7-se** et α la fraction de sites de liaison libres.

$$K_d = \frac{\alpha}{(1 - \alpha)} \times R_0 - nP_0(1 - \alpha) \quad (1) \quad \rightleftharpoons \quad P_0\alpha = \frac{1}{n} \times \frac{R_0\alpha}{(1 - \alpha)} - \frac{K_d}{n} \quad (2)$$

En traçant $P_0 \cdot \alpha$ en fonction de $R_0 \cdot \alpha / (1 - \alpha)$, une constante de dissociation $K_d = 3,6 \mu\text{M}$ avec $n = 1,4$ est obtenue pour le complexe **7-pe**. De la même manière le complexes **7-se** donne un $K_d = 0,04 \mu\text{M}$ et $n = 0,75$. Le nombre de sites de liaison n est proche de 1, les complexes n'occupent que le site principal de liaison de la β -Lg. Les complexes présentent des constantes de dissociation avec la β -Lg, qui se trouvent être assez différentes des constantes de dissociation des acides gras respectifs. Plus la constante K_d est petite plus l'insertion est favorisée, par conséquent le complexe **7-se** qui a une constante plus petite que l'acide stéarique aura une meilleure insertion. A l'inverse le complexe palmitique **7-pe** avec un K_d plus élevé que l'acide palmitique s'insèrera moins facilement (Tableau 2). Par conséquent, la présence de la tête organométallique volumineuse attachée à la queue lipidique a entraîné la liaison du complexe **7-pe** à la protéine avec une affinité un peu moins bonne que pour l'acide gras seul. Tandis que pour **7-se**, les nouvelles liaisons hydrogènes formées vont réellement permettre au complexe **25-pe** de se fixer dans la β -Lg avec une meilleure affinité que pour l'acide gras seul.

	K_d (μM)	Stœchiométrie (n)
7-pe	3,25	1,4
7-se	0,04	0,75
Acide palmitique	0,1	0,93
Acide stéarique	0,16	0,9

Tableau 2: K_d des complexes et des acides gras correspondants (39).

En résumé, la spectroscopie CD et la spectroscopie de fluorescence fournissent des indices solides de l'association des complexes **7e** à la β -Lg.

VII. Etudes de stabilité de l'hybride β -Lg c Pd.

1. Ultrafiltration

Nous avons cherché à vérifier la force de l'association des complexes et de la protéine dans les conditions qui seront utilisées pour les catalyses. Une manière possible d'observer cette association est l'utilisation de l'ultrafiltration. Cette technique de séparation utilise des membranes semi-perméables dont le diamètre des pores est compris entre 0,001 et 0,1 micromètre. L'ultrafiltration n'est pas fondamentalement différente de la microfiltration ou de la nanofiltration, si ce n'est qu'elle retient des matières de tailles différentes de ces dernières. L'ultrafiltration est majoritairement utilisée pour séparer des particules dissoutes alors que la microfiltration est majoritairement utilisée pour séparer des particules en suspension. Le mécanisme de séparation se fait par tamisage : le transfert a lieu dans une membrane poreuse et résulte de la différence de la taille des composants par rapport à celle des pores de la membrane. Ici les filtres choisis ont un seuil de coupure de 10K ce qui signifie que toutes les molécules de moins de 10000 Da vont passer dans le compartiment inférieur tandis que les molécules de plus de 10000 Da seront retenues par le filtre. Dans notre cas la β -Lg de MW = 18 363 Da sera retenue par la membrane et restera dans le compartiment supérieur. Les complexes quant à eux ont une masse comprise entre 600 et 800, et ne devraient donc pas être retenus par la membrane et par conséquent devraient passer dans le filtrat au niveau de la partie inférieure. Néanmoins si l'association supramoléculaire entre la β -Lg et les complexes est effective et suffisamment forte alors le complexe restera dans le compartiment supérieur puisqu'il sera inséré dans la protéine.

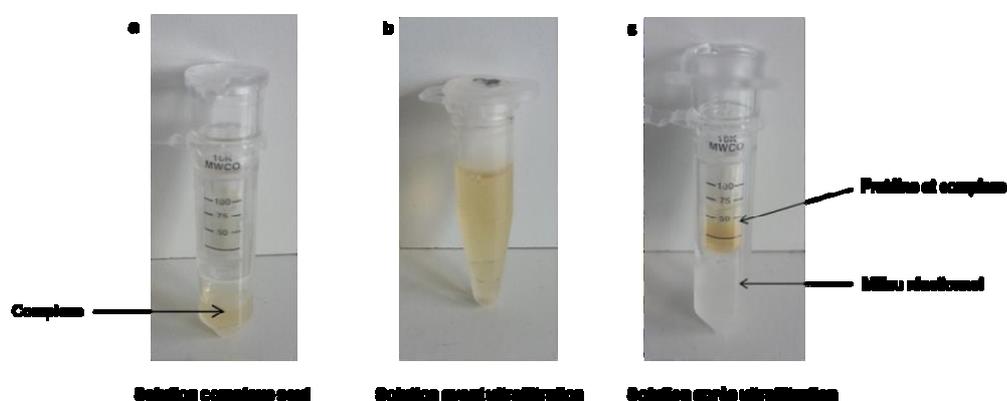


Figure 42 : Image des différentes solutions de 7-pb pour l'ultrafiltration

Dans une première expérience le complexe de palladium **7-pb** est mis dans la solution tampon et après 8 h la solution est centrifugée. Après l'ultrafiltration la couleur jaune est trouvée aussi bien dans le compartiment inférieur que dans le compartiment supérieur du filtre (Figure 42-**a**). Ceci montre que sans la protéine, le complexe **7-pb** n'est pas retenu par la membrane.

Dans une seconde expérience, nous avons incubé le complexe de palladium **7-pb** en présence de la protéine pendant 8h sous agitation dans le tampon phosphate. L'ensemble de la solution est teintée d'un jaune clair dû à la présence du complexe de palladium qui est jaune (voir Figure 42-**b**), tandis que la protéine seule en milieu aqueux est incolore. Ensuite l'ultrafiltration a été réalisée par centrifugation. on constate que la partie supérieure où se trouve la protéine est colorée en jaune alors que la partie inférieure, est incolore (Figure 42-**c**). Cela semble témoigner de la présence du complexe avec la protéine. En effet le complexe étant responsable de la coloration de la solution, il est tout à fait raisonnable de penser que le complexe est resté associé à la protéine et qu'il ait été retenu par la membrane du filtre. De plus, une mesure UV du compartiment inférieur a été réalisée. Aucune absorption à 310 nm n'est observée ce qui permet de confirmer que le complexe ne s'y trouvait pas. Ceci confirme donc que le complexe est bien resté associé à la protéine.

2. Chromatographie d'exclusion de Taille (SEC)

Afin d'apporter une preuve supplémentaire que le complexe **7-pb** réalise bien son insertion dans la protéine au niveau du β -barrel et non simplement à la surface de la protéine, un mélange stoechiométrique de protéine et de complexe a été soumis à une chromatographie d'exclusion de Taille (« size exclusion chromatography », SEC) connue aussi sous le nom de la chromatographie de filtration sur gel ou chromatographie liquide d'exclusion. La séparation des protéines et d'autres composés par SEC est basée sur la taille des molécules dans l'échantillon. La technique utilise un gel qui contient des petites sphères poreuses comme phase stationnaire dans la colonne de chromatographie. En se basant sur la distribution de grandeurs de ces sphères, les petites molécules de l'échantillon diffusent dans les pores, leur mouvement est ainsi ralenti. En revanche, les molécules plus grandes ne traversent pas les pores, elles sont éluées plus rapidement. Ainsi, des molécules sont séparées sur la base de leur taille.

La caractéristique la plus importante des systèmes supramoléculaires est que les composants sont liés de manière réversible par des forces intermoléculaires, et non par des liaisons covalentes. Les composés supramoléculaires sont des agrégats réversibles qui peuvent se

casser et se recombinaient à des échelles de temps expérimentales. Ceci contraste nettement avec l'application SEC classique aux composés qui sont formés via des liaisons covalentes et suffisamment stables dans des conditions chromatographiques.

Dans l'analyse par SEC des complexes supramoléculaires, une question très importante à considérer est leur possible dissociation. En effet, pour l'analyse des complexes non covalents, l'applicabilité de la SEC dépend fortement de la stabilité de l'échantillon. Les exemples couronnés de succès incluent l'analyse de complexes métalliques stables et de complexes protéiques.^{41, 42} Toutefois, pour les complexes moins stables, les procédures normales de la SEC ne sont pas adéquates. Ces complexes se dissocieront pendant le processus chromatographique, ce qui réduira le temps de rétention et modifiera les poids moléculaires mesurés.

Malgré le manque d'études fondamentales, des applications intéressantes de la SEC dans la caractérisation et / ou la confirmation de l'assemblage supramoléculaire ont déjà été publiées^{43,44, 45}. Dans ces applications, la SEC a fourni de solides preuves pour la formation d'un assemblage réversible. On a également démontré qu'un complexe stable donnait un pic chromatographique net et bien défini, tandis qu'un complexe moins stable donnait un pic élargi qui devait être dû à la dissociation du complexe sur la colonne SEC. Aucun effort n'a été fait dans ces articles pour corrélérer davantage le comportement de rétention de la SEC avec la stabilité du complexe et avec les paramètres chromatographiques correspondants.

C'est pourquoi nous avons réalisé la SEC après avoir laissé incuber la β -Lg avec le complexe de palladium **7-pb** dans le tampon phosphate pendant 6 h. Après ajout de la métalloenzyme sur la colonne, douze fractions de 1 mL sont collectées. Chacune de ces fractions est analysée par UV afin de déterminer la zone de sortie de la protéine et du complexe si une séparation est observée. Lors de cette élution, seules 3 fractions (2-4 voir Figure 43) présentent une absorbance à 280 nm qui est la zone d'absorbance de la protéine. Cependant comme la protéine et le complexe absorbent dans la même zone en UV il est difficile de quantifier la quantité de palladium. Néanmoins le complexe étant plus petit il devrait être retenu par les cavités sphériques et donc être élué après la protéine, mais aucune autre fraction ne présente d'absorbance en UV ce qui laisse à supposer que la métalloprotéine formée ne s'est pas dissociée sur la colonne. Il semble donc que le complexe s'insère bien dans le calice de la β -Lg et ne s'associe pas seulement à la surface de la protéine.

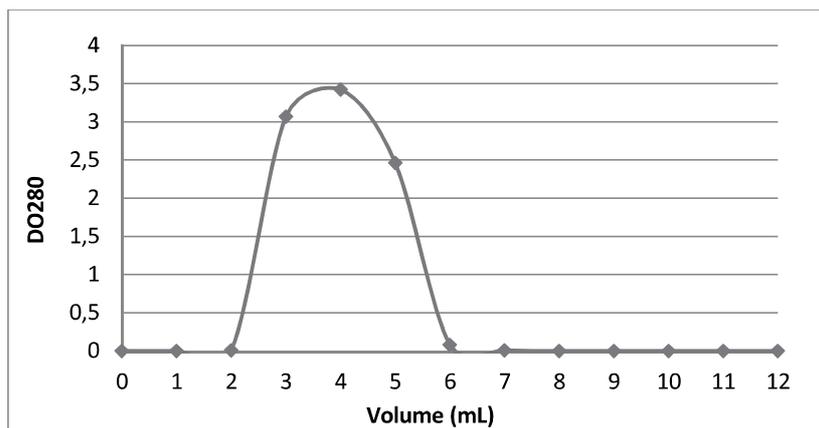


Figure 43 : Chromatogramme du mélange β -Lg et complexe 7-pb après SEC.

Enfin nous avons réuni toutes les fractions contenant la protéine afin de nous s'assurer de la présence du complexe à l'intérieur nous avons réalisé une ultrafiltration sur ces fractions afin de reconcentrer l'échantillon en protéine. Une fois l'ultra filtration terminée, la couleur jaune due à l'association de la protéine et du complexe est observée. En effet la protéine est incolore en solution tandis que le complexe est jaune (Figure 44). Le fait que l'on retrouve la couleur jaune laisse supposer que la métalloprotéine est toujours formée et ce même après la SEC. La métalloprotéine formée semble être capable de résister aux conditions de catalyse et ne pas se dissocier au cours du temps



Figure 44 : Ultrafiltration des fractions 2 à 4 après SEC.

VIII. Réactivité des hybrides

La difficulté avec les métalloenzymes artificielles est de trouver une réaction qui puisse être catalysée par le métal choisi et compatible avec le milieu aqueux. Avec les complexes de palladium, un grand nombre de réactions est possible. Cependant il faut trouver des réactions où les réactifs soient compatibles avec l'eau et que le produit de réaction présente un ou plusieurs centres stéréogènes. Dans un cas idéal il faudrait aussi que la réaction ne puisse pas se faire en l'absence de catalyseur.

Les complexes à pinces de palladium présentent des propriétés catalytiques polyvalentes. En particulier, en raison de leur caractère acide de Lewis, provenant du ligand chlorido labile, ces complexes ont été utilisés avec succès dans des réactions de type condensation d'aldol et addition de Michael. Ces deux réactions sont synthétiquement très utiles car elles impliquent la formation de liaisons C-C et la création de centres stéréogènes.

3. Réactions de condensation d'aldol

a. Rappel bibliographique.

L'une des principales réactions de formation C-C catalysées par le palladium est la condensation d'aldol entre l'aldéhyde **9a** et l'isocynoacétate **10a** afin de former l'oxazoline **11a**, qui peut être hydrolysée en β -hydroxyaminoacide **12a**. Ainsi un grand nombre de synthèses asymétriques ont été mises en place de manière à fournir le β -hydroxyaminoacide **12a** énantiomériquement pur. Pour cela de nombreux complexes à pinces chiraux ont été développés.^{46,47,48,49,50}

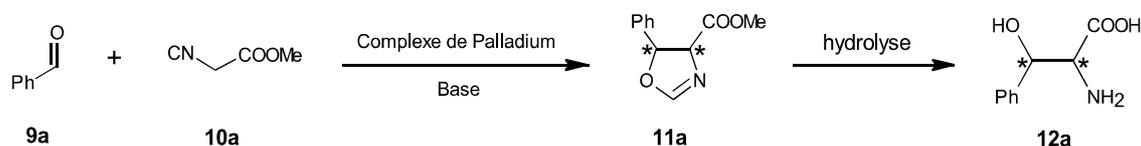


Schéma 22: Réaction de condensation d'aldol entre le benzaldéhyde et le méthylisocynoacétate.

La version catalysée de la réaction de condensation d'aldol est effectuée en présence de base telle que [NEt(iPr)₂], ce qui est nécessaire pour l'énolisation du composant isocyanure.

Les complexes contenant du platine et du palladium se sont révélés être des catalyseurs efficaces pour la synthèse des dérivés oxazolines. Venanzi⁴⁶ et ses collègues ont signalé la première réaction de condensation d'aldol énantiosélective en utilisant des complexes de platine **Cat-6** (Schéma 23). La réaction a donné un mélange de deux diastéréomères **11a** et un ee jusqu'à 65%. Le diastéréomère majoritaire, *Trans*, est obtenu avec une énantiosélectivité supérieure à celle du diastéréomère *cis*. La substitution en ortho du cycle aromatique de l'aldéhyde **9a** a conduit à l'amélioration de la diastéréosélectivité, cependant, l'énantiosélectivité a diminué.

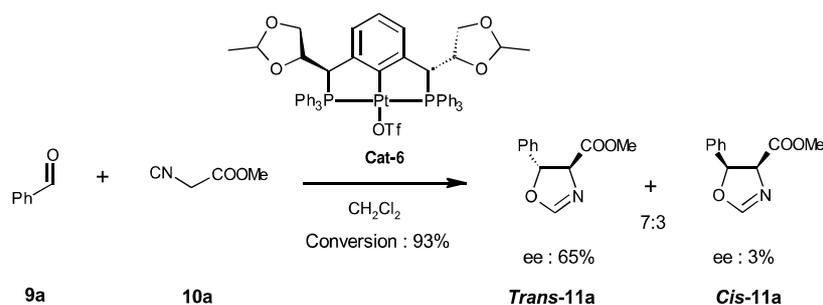


Schéma 23 : Condensation d'aldol par Venanzi.

Zhang⁴⁷ et ses collègues ont utilisé un complexe chiral du palladium relativement simple **Cat-7**. Le catalyseur activé par le triflate d'argent a donné des mélanges de diastéréoisomères *Cis* et *Trans* (Schéma 24). Fait intéressant, ce catalyseur a donné le produit *Cis* avec une énantiosélectivité supérieure à celle du produit *Trans*. Les meilleurs résultats (jusqu'à 71% ee) ont été obtenus à l'aide du mésitaldéhyde **9b** (Schéma 24).

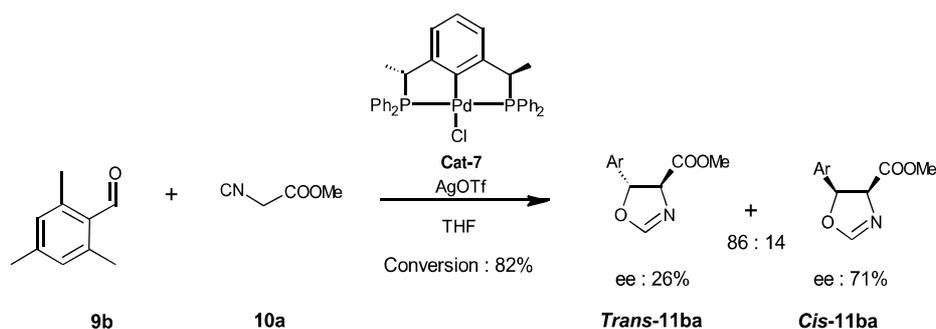


Schéma 24 : Condensation d'aldol par Zhang.

Van Koten et ses collègues ont utilisé des complexes chiraux NCN du palladium à base de pyrrolidine pour atteindre des énantiosélectivités jusqu'à 42%. Des études ultérieures ont montré que la diastéréosélectivité des réactions catalysées par le complexe à pince peut être considérablement améliorée par la variation de l'isocyanure utilisé. Ainsi, Motoyama⁴⁸ et ses collègues ont fait réagir l'isocyanure de tosylméthyle **10b**, avec divers aldéhydes en présence de complexes de palladium et de platine (**Cat-8**) à base de ligand phebox (Schéma 25) pour obtenir exclusivement des dérivés de *Trans* oxazolidine (**11ab**). Comme pour les études ci-dessus, le degré d'échantionnement dépend de la structure de l'aldéhyde.

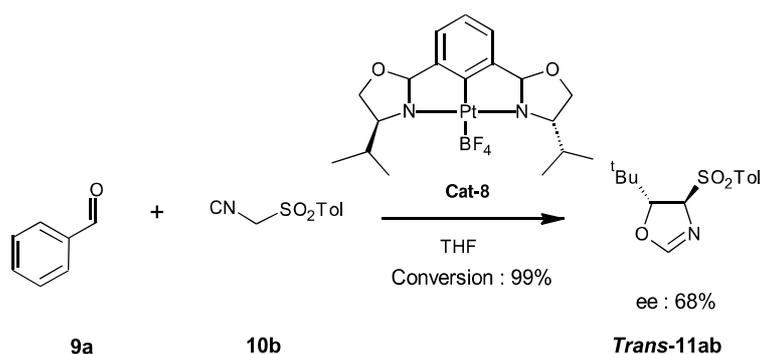


Schéma 25 : Condensation d'aldol par Motoyama.

Van Koten,^{50 51, 52} et ses collègues ont également développé une nouvelle génération de catalyseurs complexes à pinces NCN chiraux facilement modulables pour la réaction de condensation d'aldol des aldéhydes et des isocyanures. Bien que les résultats préliminaires pour le couplage de **9a** et **10a** présentent des énantiosélectivités inférieures aux complexes décrits ci-dessus (**Cat-6**, **Cat-8**), une meilleure optimisation des conditions de réaction et des substrats devrait augmenter considérablement la sélectivité de ces catalyseurs.

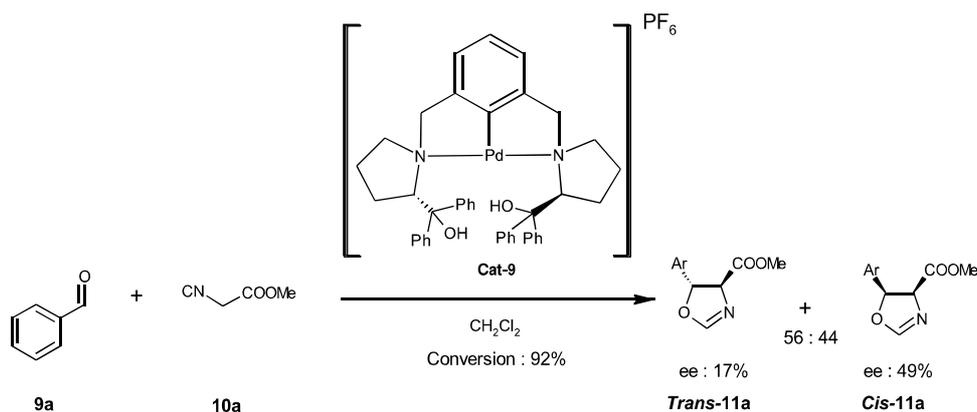


Schéma 26 : Condensation d'aldol par van Koten

Comme on peut le voir avec la plupart des catalyseurs de la littérature décrits précédemment, la chiralité se trouve plus éloignés que sur les complexes **7-pa**, **7-pb**, **7-pc**, **7-pe**, **7-le** et **7-se** ou le centre asymétrique se trouve directement sur l'azote et pourra potentiellement fournir un meilleur transfert de chiralité en plus de la protéine. Il est donc possible d'imaginer que ces nouveaux complexes permettront un enrichissement au niveau du transfert de chiralité du produit.

b. Condensation d'aldol entre le méthylisocyanoacétate et le benzaldéhyde dans l'eau.

Pour cette réaction de condensation d'aldol les réactifs classiquement utilisés ont été sélectionnés, ainsi le méthylisocyanoacétate **10a** et le benzaldéhyde **9a** ont permis d'étudier l'activité des complexes de palladium **7**.

Cette réaction de condensation d'aldol n'a jamais été reportée en milieu aqueux. Les premières expériences ont été réalisées avec les substrats de référence, l'isocyanoacétate de méthyle et le benzaldéhyde seuls dans un tampon phosphate à pH 7,5 (Schéma 27).

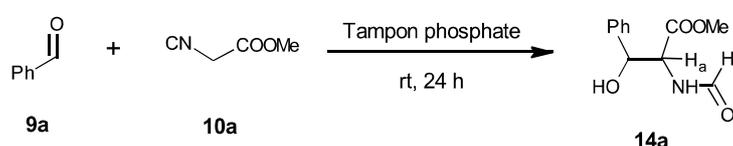


Schéma 27 : Réaction de condensation d'aldol témoin

Ce premier test a permis de connaître la stabilité des réactifs et des produits en milieu aqueux. Après 24 h à 25°C, le milieu réactionnel est extrait avec de l'éther d'éthyle et la RMN ¹H du brut de réaction montre la formation d'un nouveau produit. Comme nous avons pu le voir précédemment, le composé attendu est l'oxazoline **11a**. Cependant, au regard de la RMN les pics caractéristiques de l'oxazoline ne sont pas retrouvés. Après avoir éliminé la possibilité de dégradation des réactifs **9a** et **10a**, il semble donc qu'un autre produit ait été obtenu. Dans ces conditions, le produit de réaction a été identifié comme un aminoalcool formylé résultant de l'ouverture du cycle oxazoline en présence d'eau. Ce formamide **14a**, présente en RMN ¹H un pic de l'aldéhyde facilement reconnaissable à 7,55 et 7,68 ppm pour les formes *Cis* et *Trans*. De plus une confirmation supplémentaire de cette forme est obtenue par spectrométrie de masse. Cette réaction a donc permis de mettre en évidence qu'en présence d'eau, ce n'est pas l'oxazoline **11a** qui est formée mais le composé **14a** résultant de son hydrolyse. Ce composé a été obtenu avec un rendement de 60 % et sous la forme de deux diastéréoisomères dans un rapport diastéréomérique *Cis* : *Trans* de 18 : 82.

Les deux formamides ne sont pas séparables sur colonne, c'est pourquoi afin d'identifier les produits *Trans* et *Cis* – formamide séparément, nous sommes passé par une synthèse d'échantillons purs mais via les oxazolines correspondantes. Ainsi la synthèse de la forme

fermée **11a** de ces composés est décrite en milieu anhydre et les formes *Cis* et *Trans* ont déjà été identifiées⁵³. Pour ce faire, le benzaldéhyde et le méthylisocynoacétate sont mis en présence d'AgOAc dans le dichlorométhane. Les oxazolines *Cis* / *Trans* sont obtenues avec un ratio de 16:84. Ces produits alors été séparés par colonne chromatographique, malheureusement, seul le produit *Trans* a été obtenu pur. Le produit *Cis* n'a pas pu être obtenu pur mais uniquement en mélange avec le formamide *Trans* mais avec cette fois dans un rapport *Cis* / *Trans* de 75/25. Les oxazolines obtenues ont par la suite été hydrolysées en présence de HCl, ce qui conduit aux formamides de référence permettant ainsi l'analyse par HPLC (voir paragraphe d.).

c. Suivi de la réaction par RMN à 25°C

De manière à pouvoir suivre l'évolution de la réaction, celle-ci a été effectuée avec 50 μmol de substrats en présence **7-pb** ou **7-pe** (10 mol%) dans 1 mL de tampon phosphate. Pour suivre l'avancement de la réaction de condensation entre **9a** et **10a**, un prélèvement de 20 μL est réalisé toutes les deux heures sur lequel une extraction au CDCl_3 est faite et ensuite analysée par RMN. Néanmoins pour réussir à quantifier la quantité de formamide **14a** formé une référence interne avec une concentration connue est ajoutée au tube RMN. Le tert-butanol a été choisi car ses méthyls sortent à 1,17 ppm, zone où aucun proton du formamide **14a** ne sort. Pour réaliser cette référence une solution de tert-butanol à 0,1 mol.mL⁻¹ dans le chloroforme est réalisée et placée dans un capillaire. Il est alors possible de mesurer le spectre RMN ¹H du formamide **14a** se formant au cours du temps et de quantifier la quantité formée en comparant la proportion de Ha de **14a** (Schéma 27) avec les protons CH₃ du tert-butanol.

Deux autres réactions ont été réalisées en parallèle suivant le même procédé que la réaction précédente (la réaction entre **9a** et **10a**). La première est effectuée en présence de 10 mol% de diisopropylethylamine suivant des conditions reportées dans la littérature⁵¹.

La deuxième réaction mise en comparaison avec la réaction des réactifs seuls **9a** et **10a** est quant à elle faite en présence de 20 mol% de complexe de palladium **7-pa**. Néanmoins, le complexe **7-pa** est très peu soluble en milieux aqueux, c'est pourquoi 10 % de méthanol est ajouté afin de faciliter la solubilisation de **7-pa** dans le tampon phosphate.

Comme on peut le voir dans la Figure 45, une conversion assez rapide se fait dans les six premières heures puis la concentration de formamide **14a** continue d'augmenter mais cette fois de manière plus lente. Après 32 h de réaction, un palier est atteint avec 60 - 70% de

conversion en fonction des réactions. On remarque que les trois réactions possèdent une vitesse assez similaire. Cependant une faible accélération est remarquée en présence de base par rapport à la réaction témoin, ce qui montre que la base a peu d'utilité pour la réaction réalisée en milieu tamponné à pH = 7,6. Quant à l'ajout du complexe de palladium **7-pa** aucune amélioration de la vitesse de réaction n'est réellement observée. Il semble que l'activité catalytique du complexe **7-pa** ne soit pas suffisante pour induire une accélération, en comparaison de la réaction témoin qui se produit déjà relativement rapidement à 25 °C. C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser la réaction à une température plus basse (4°C) pour le suivi cinétique, ceci afin de ralentir la réaction non catalysée entre les deux réactifs **9a** et **10a**.

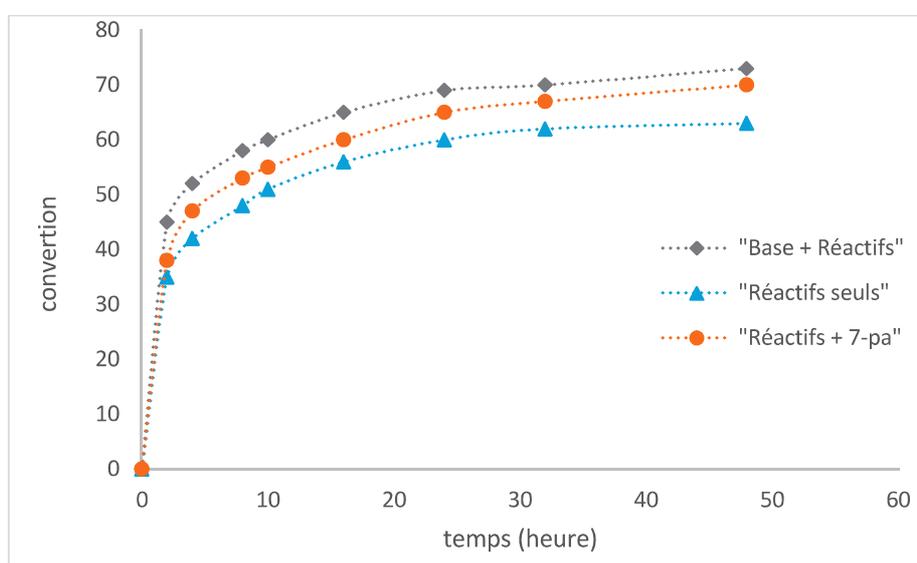


Figure 45 : Suivi par RMN ^1H de la formation du formamide à 25°C.

d. Suivi de la réaction par RMN à 4°C

Les mêmes tests catalytiques que précédemment sont réalisés mais cette fois à 4 °C et en faisant varier la quantité de méthanol introduit pour faciliter la dissolution du complexe. Ces réactions sont cette fois-ci réalisées dans D_2O afin d'éviter l'extraction, et le spectre RMN ^1H est mesuré directement toutes les 2 h. Dans ce cas, c'est la disparition du proton du benzaldéhyde qui est suivie au cours du temps car le proton Ha du produit formé est caché par le pic de l'eau qui est très important (Figure 46). On observe que même dans ces conditions le complexe à pinces de palladium **7-pa** ne permet pas à la réaction d'évoluer vraiment plus rapidement que la réaction témoin. Cependant le manque de solubilité du complexe **7-pa** est mis en évidence car la réaction faite en présence de 20% de méthanol démarre plus rapidement que les deux autres réactions et semble légèrement plus rapide (Figure 46).

Jusqu'à présent, les complexes NCN-chlorido métalliques **7** correspondants n'ont pas signalé une activité notable dans cette réaction. On peut supposer que ces complexes n'ont pas de site vacant permettant au ligand nucléophile de se lier, il est possible que la labilité du ligand chlorido ne soit pas suffisante pour former les complexes aqua une fois mis en milieu aqueux.

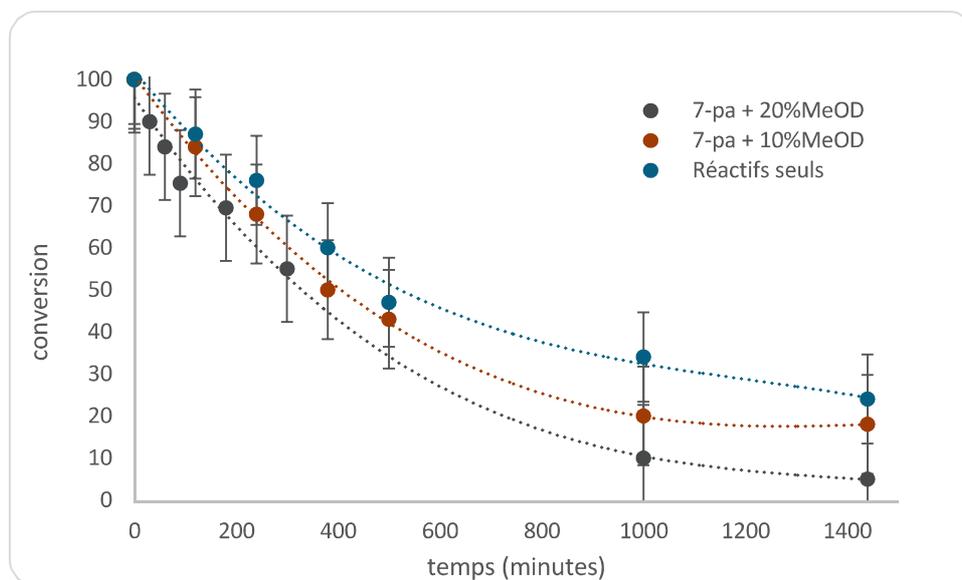


Figure 46 : Suivi par RMN à 4°C en présence de 10 mol% du complexe 7-pa.

Par la suite, un test a été réalisé afin de vérifier que le palladium possède bien un pouvoir catalytique en milieu aqueux et permet d'accélérer la réaction. Pour cela $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ est utilisé comme complexe analogue de **7-pa**. Dans ce cas, la réaction est réalisée avec 10 mol% de palladium acétate et suivie par RMN en présence de D_2O à 4°C. On peut constater sur la Figure 47 une disparition totale du benzaldéhyde en 1h30. Le palladium peut donc être utilisé afin d'accélérer la réaction de condensation d'aldol en milieu aqueux. L'analyse par RMN¹H du produit brut après extraction indique qu'il est obtenu un mélange de diastéréoisomères *Cis/Trans* dans la proportion 18/82.

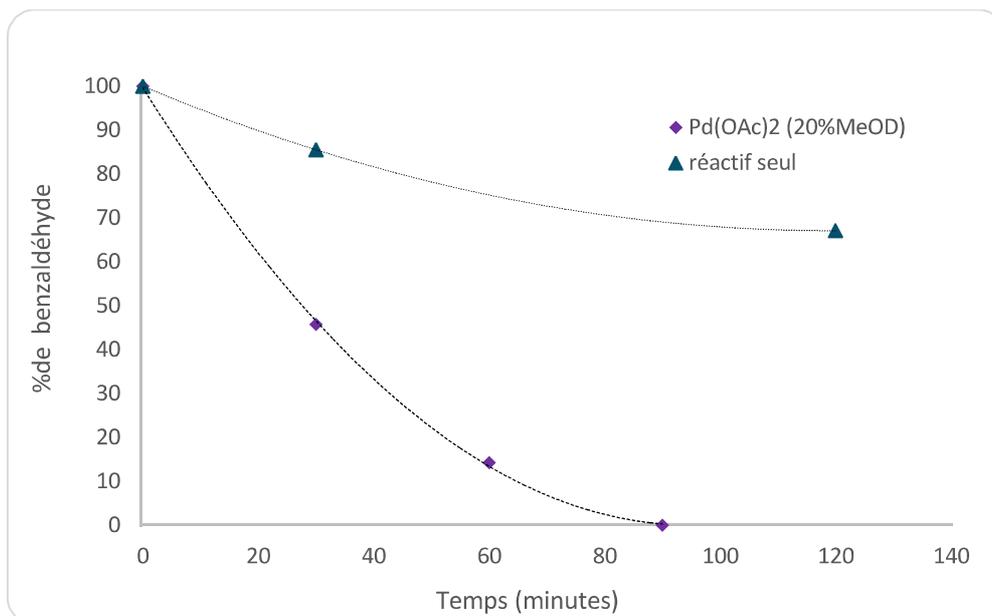


Figure 47 : Suivi par RMN à 4 °C en présence de 10%mol de Pd(OAc)₂.

Au vu des résultats obtenus avec le palladium acétate et le complexe neutre **7-pa**, les complexes à pinces cationiques **7-pa⁺** et **7-pc⁺** ont été envisagés pour cette réaction. Avant les essais de catalyse, les complexes à pinces **7-pa** et **7-pc** ont été traités avec 1 éq. AgBF₄ pour générer les complexes cationiques et les sels d'argent ont été soigneusement éliminés du mélange réactionnel par filtration sur célite.

En effet, ces complexes présentent une réactivité plus importante et devrait faciliter la coordination de l'isocynoacétate. De plus la forme cationique des complexes devrait aussi permettre de pallier aux problèmes de solubilité observée plus tôt avec le complexe chloré neutre **7-pa**. Comme on peut le voir sur le Figure 48, les deux complexes cationiques **7-pa⁺** et **7-pc⁺** accélèrent la réaction en comparaison avec la réaction témoin. En effet, au bout de 8 h, 85 % du benzaldéhyde a disparu avec le complexe **7-pa⁺** contre 70 % en présence de **7-pc⁺** et 50% pour la réaction sans catalyseur. La différence de vitesse entre **7-pa⁺** et **7-pc⁺** peut être due à la différence de solubilité des complexes. Le complexe **7-pc⁺** possède un benzyle et un éthyle au niveau de l'azote alors que le **7-pa⁺** lui possède seulement deux méthyles. Le fait que le complexe **7-pa⁺** possède des groupements plus petits au niveau de l'azote laisse à penser que ce complexe sera plus soluble dans le tampon aqueux que le complexe **7-pc⁺**, ceci peut être une des raisons de la meilleure activité de **7-pa⁺** par rapport à **7-pc⁺**. Néanmoins, cette fois les complexes de palladium cationiques semblent avoir une influence sur la vitesse de réaction, il est donc possible de les envisager pour la catalyse en présence de la β -Lg.

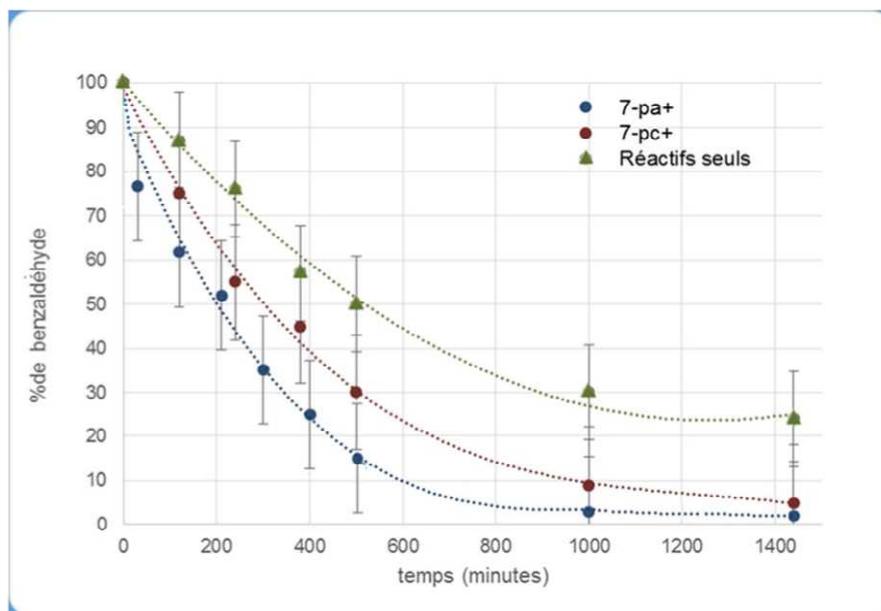


Figure 48 : Suivi par RMN en présence des complexes cationiques à 4 °C

En conclusion, il semble que les complexes à pinces chloré tels que **7-pa** ne soient pas très actifs pour cette catalyse. En effet, lors de l'ajout du complexe **7-pa** en milieu aqueux, la labilité de la liaison **Pd-Cl** n'est probablement pas suffisante pour avoir la formation du complexe aqua de manière spontanée, ce qui diminue fortement le caractère acide de Lewis du complexe **7-pa**. Il est possible de constater que lorsque cette aquation est favorisée par la formation préalable des complexes cationiques **7-pa⁺** et **7-pc⁺** une augmentation de la réactivité est observée, même si cette réactivité reste plus faible que celle du Pd(OAc)₂. Néanmoins il ne faut pas oublier que ces complexes sont mis à réagir en milieu aqueux sans la protéine, il est donc aussi possible que le manque de solubilité soit aussi en grande partie responsable de ce manque de réactivité.

Enfin ces résultats ont été obtenus à des concentrations en substrats **9a** et **10a** très élevées par rapport à celle que l'on devra utiliser en présence de protéine. La présence de 50 μmol de substrats laisse supposer que pour réaliser la réaction en présence de 10 mol% de protéine, il faudrait environ 1g de β-Lg, ce qui ne sera pas soluble dans 1 mL de tampon. Pour effectuer la réaction dans 1 mL avec des quantités raisonnables de β-Lg, il faudra alors diminuer la concentration en réactif par 20. La vitesse de réaction en l'absence de catalyseur devrait se trouver très fortement ralentie en raison de la forte dilution, ainsi la réactivité des complexes devrait être plus significative. Ces expériences se faisant sur de très petites quantités de

produit, il ne sera plus possible de réaliser un suivi RMN, c'est pour cette raison que les expériences suivantes ont été analysées par HPLC.

e. Suivi par HPLC

Ensuite, la réaction a été effectuée à l'échelle analytique avec 2,5 μmol de substrats en présence de β -lactoglobuline (15 mol%) et **7-pb⁺** ou **7-pe⁺** (10 mol%). Comme expérience de contrôle, la même réaction a été effectuée en l'absence de protéine et de complexe. La disparition du benzaldéhyde a été suivie par analyse RP-HPLC des mélanges réactionnels toutes les 15 min (Figure 49). De manière remarquable, la disparition du benzaldéhyde est très lente en l'absence de catalyseur de palladium. A l'inverse la consommation rapide de benzaldéhyde a été observée en présence de 10 mol% de **7-pb⁺** seul ou de β -LG-**7-pb⁺**, tandis que la disparition du benzaldéhyde est beaucoup plus lente en présence de **7-pe⁺** et de β -LG-**7-pe⁺**. Ce manque d'activité de **7-pe⁺** pourrait être attribué à la présence de groupes de coordination OH dans la position β des atomes d'azotes qui rivalisent avec l'isocynoacétate **10a** pour se lier au site de coordination libre sur le centre métallique. Néanmoins, on aurait pu penser qu'une fois le complexe **7-pe⁺** inséré dans la protéine, la vitesse aurait augmenté. En effet lors du docking les deux OH du complexe semblaient établir une liaison hydrogène avec la β -Lg. Il y aurait alors la possibilité de libérer le palladium de cette complexation avec le OH et ainsi libérer l'accès pour l'isocynoacétate. Cependant comme on peut le voir la vitesse change très peu, la force des liaisons hydrogènes avec la protéine ne doit donc pas être assez forte pour empêcher la formation de la liaison Pd-O.

D'un autre côté, on constate aussi que la présence de la protéine a finalement une faible influence sur la vitesse de réaction. En général, l'insertion des complexes dans une protéine hôte tend à ralentir la réaction, ici la réaction n'est ralentie que très légèrement, l'accès au centre catalytique par les réactifs reste semble-t-il suffisant même après insertion dans la β -Lg.

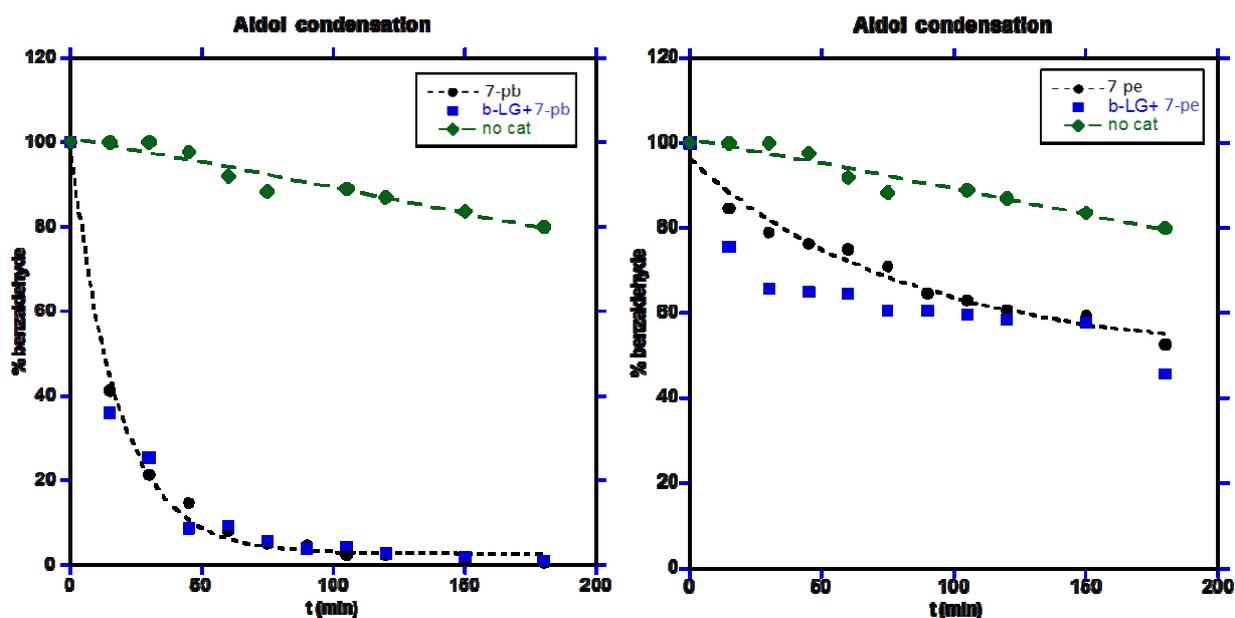


Figure 49 : Cinétique de réaction des réactifs seuls, et des réactifs en présence des complexes 7-pe et 7-pb avec et sans β -Lg.

La conversion en formamide et le rapport diastéréomérique sont déterminés par analyse RP-HPLC des milieux réactionnels après 3 h 30 (Tableau 3). En l'absence de catalyseur, la conversion en formamide est très modeste et on obtient le produit sous la forme d'un mélange 50: 50 d'adduits *Cis* et *Trans*. Les deux complexes à pinces ont montré une certaine activité catalytique, mais **7-pb⁺** était beaucoup plus actif que **7-pe⁺**. Dans les deux cas, aucune diastéréosélectivité n'a été observée puisque le formamide **14a** a été obtenu avec un rapport *Trans* / *Cis* de 50/50. Enfin, lorsque la réaction a été effectuée en présence de β -Lg, des conversions légèrement inférieures ont été observées (par rapport aux complexes seuls) ainsi qu'une induction modérée de diastéréosélectivité en faveur de l'isomère *Cis* pour β -Lg**7-pb⁺** ou l'isomère *Trans* pour β -Lg**7-pe⁺**.

Au vu de ces résultats, les complexes **7-pb⁺** et **7-pe⁺** ont bien une activité sur la réaction. De plus la présence de la protéine permet d'avoir une influence sur la diastéréosélectivité de la réaction ce qui montre que la seconde sphère de coordination a bien un effet sur la sélectivité de la réaction.

Tableau 3 : Réactivité des complexes 7-pb⁺ et 7-pe⁺ sur la réaction de condensation d'aldol entre 9a et 10b.

Entrée	β-Lg (mol%)	Complexe	Conversion (%) ^a	Trans/Cis ^a	e.r. (Trans) ^b
1	0	-	3	50/50	50/50
2	15	-	2	50/50	50/50
3	0	7-pb⁺	56	46/54	50/50
4	15	7-pb⁺	49	38/62	50/50
5	0	7-pe⁺	7	49/51	50/50
6	15	7-pe⁺	5	62/38	57/43

a) Conversion obtenue après 3 h 30 à température ambiante. Rapport déterminé par RP-HPLC sur colonne Nucleosil C18 HTec, avec H₂O/MeCN 95/5 à 0/100 en 40 min.

b) Déterminé par HPLC sur Kromasil 5-cellucoat, avec hexane/isopropanol 98/2 pendant 19 min puis à 96/4 pendant 11 min à 1 mL/min.

On s'est ensuite questionné sur l'énantiosélectivité de la réaction. Pour cela, après 3 h 30, les produits sont extraits avec le diisopropyl éther puis séchés de manière à pouvoir être analysés par HPLC sur colonne Chirale. De cette manière, les différents énantiomères *Cis* et *Trans*, ont pu être séparés mais malheureusement aucun enrichissement énantiomérique n'est observé. Il semble donc que l'insertion des complexes **7-pb⁺** et **7-pe⁺** dans la protéine ne permette pas à la seconde sphère d'avoir une influence suffisante pour induire une énantiosélectivité.

4. Condensation d'aldol entre le Tert-butyloxyacétate et le pivalaldéhyde

Par la suite, une autre condensation d'aldol a été envisagée mais cette fois entre le pivalaldéhyde **9c** et le tert-butyloxyacétate **10c**. Ces substrats **9c** et **10c** sont beaucoup plus encombrés, ainsi la seconde sphère de coordination de la protéine pourrait avoir davantage d'influence sur l'approche de ces composés, une fois associé au complexe de palladium. De plus, ces réactifs possèdent l'avantage d'avoir la forme *Trans*-formamide **14c** connue et déjà décrite et donc plus facile à analyser par RMN.⁵⁴

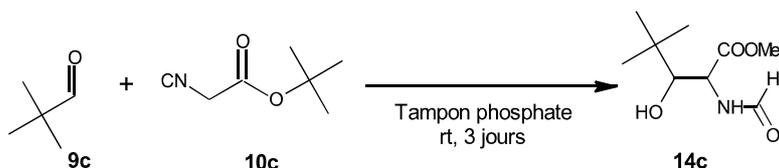


Schéma 28 : Réaction de condensation d'aldol entre le pivalaldéhyde **9c et le tert butylisocynoacétate **10c**.**

Comme pour la condensation d'aldol précédente la réaction entre **9c** et **10c** n'a jamais été réalisée en milieu aqueux à notre connaissance (Schéma 28). Cependant, le *Trans*-formamide a déjà été obtenu par réaction avec un complexe d'Argent dans l'éthyle acétate. La forme oxazoline **11c** n'étant pas stable, l'hydrolyse en présence d'HCl a été rapidement effectuée afin d'obtenir le formamide **14c**. De la même manière que précédemment un test de réactivité et de stabilité des réactifs a été effectué en laissant les réactifs dans le tampon phosphate. Contrairement à la réaction précédente avec le benzaldéhyde et le méthylisocynoacétate, après 3 jours, aucun produit n'est formé et les réactifs sont retrouvés (entrée 1 du Tableau 4).

L'addition de 10% en moles de Pd(OAc)₂ au mélange de substrats (**9c** et **10c**) a donné exclusivement le produit *Trans*-formamide avec une conversion de 60% (entrée 2 du Tableau 4) qui a servi de référence. Par la suite, le complexe à pinces **7-pa⁺** a été utilisé pour catalyser cette même condensation avec et sans protéine. On observe des conversions plus faibles et l'analyse du brut réactionnel par HPLC-chirale présente, en plus des deux pics correspondants à l'énantiomère *Trans*, deux nouveaux pics lors de la catalyse en présence de protéine.

Tableau 4 : Réactivité des complexes Pd(OAc)₂ et β-LgC 7-pa⁺ sur la réaction de condensation d'aldol entre 9c et 10c.

Entrée	β-Lg (mol%)	Complexe (10mol%)	Conversion (%) ^a	Trans/Cis ^a
1	0	0	0	-
2	0	Pd(OAc) ₂	60	100/0
3	0	7-pa⁺	44	100/0
4	10	7-pa⁺	9	85/15

a) conversion obtenue après 3 jours à température ambiante, le ratio est déterminé par HPLC sur Kromasil 5-cellucoat, avec hexane/isopropanol 98/2 pendant 19 min puis à 96/4 pendant 11 min à 1 mL/min.

Suite à la présence de ce nouveau produit inconnu, une étude par UPLC-MS a été réalisée afin de déterminer à quoi correspondent ces deux nouveaux pics observés en HPLC-Chirale. Pour cela trois échantillons ont été analysés et ont donné les profils suivants : la référence *Trans*-formamide obtenue par le Pd(OAc)₂ (Figure 50 a), les produits de catalyse obtenus par l'utilisation de **7-pc⁺** (Figure 50 b), et enfin le produit de catalyse avec **7-se⁺** (Figure 50 c).

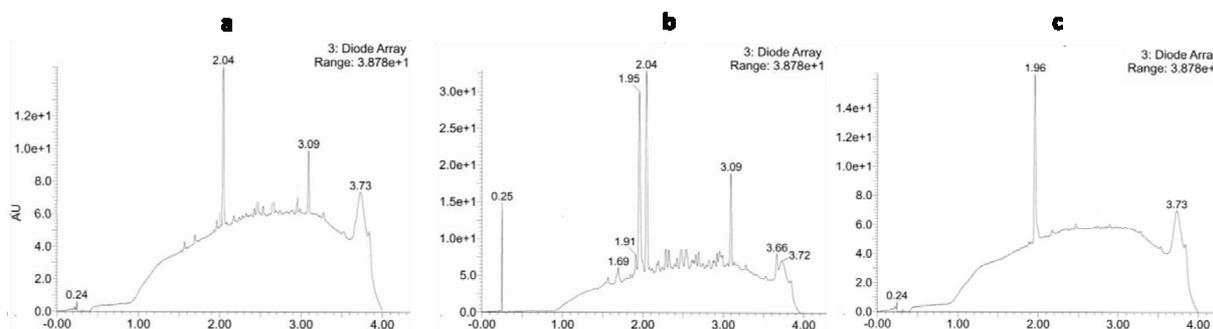


Figure 50 : Chromatogrammes UPLC-MS des produits de catalyse.

Le produit de référence (*Trans*) donne un pic unique à 2,04 min. Dans le spectre de masse correspondant (Figure 51), quatre espèces majoritaires sont identifiables. Un premier pic à m/z 268 correspondant au produit associé à un ion sodium. Le pic majoritaire à m/z 190 correspond quant à lui au départ d'isobutène par un réarrangement de McLafferty comme illustré par la Figure 52. La facilité de formation de ce réarrangement explique que ce pic soit majoritaire. Le pic à m/z 212, correspond lui aussi à ce réarrangement mais associé à un ion Na. Enfin le pic à m/z 117 montre une perte à la fois de l'isobutène et du tert-butanol.

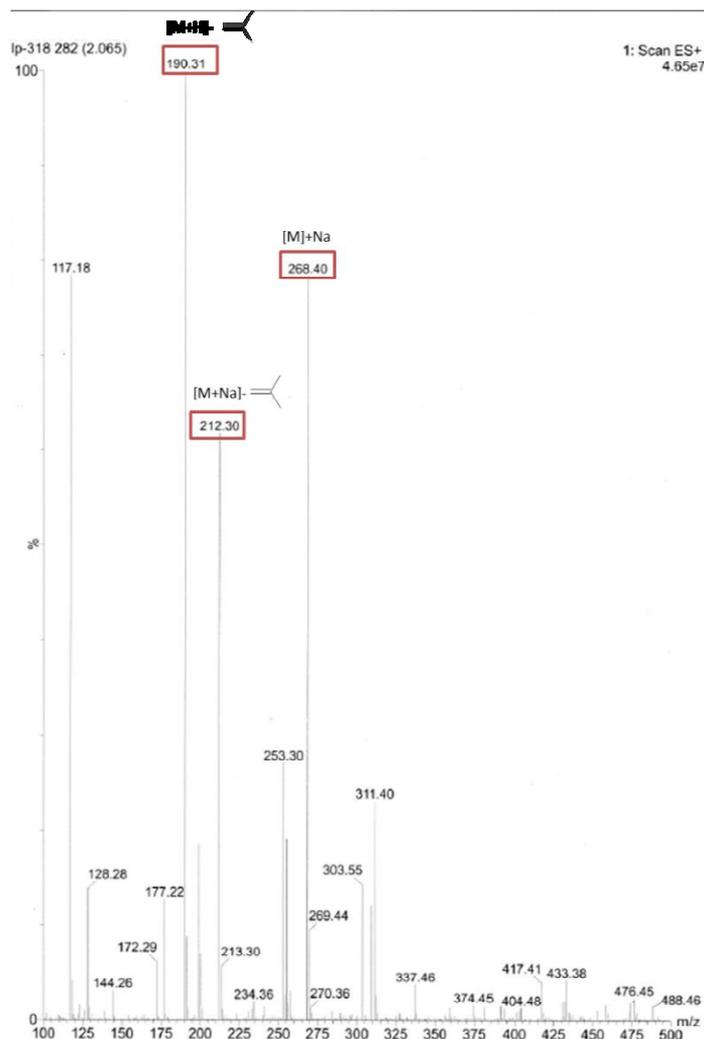


Figure 51 : Spectre de masse du pic à 2,04 min du chromatogramme du produit de référence (Trans)

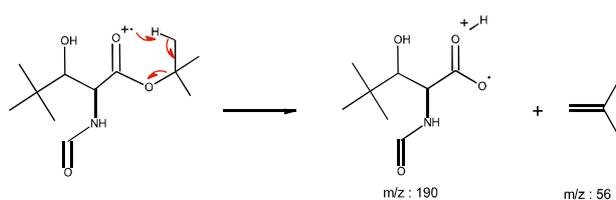


Figure 52 : Réarrangement de McLafferty.

Pour le deuxième échantillon, les deux produits en proportion 50 : 50 sont repérés à 1,95 et 2,04 min. Comme attendu, pour le produit à 2,04 min, le même spectre de masse (Figure 53) que pour le produit *Trans* pur est retrouvé. Enfin le pic à 1,96 min donne un spectre de masse présentant les mêmes pics que pour l'espèce à 2,04 min. Le pic majoritaire à m/z 190 est retrouvé de même que les pics à m/z 212 et 268. Des pics supplémentaires apparaissent à m/z 116, 144 et 162. Le pic à m/z 144 correspond à la perte de la partie ester, de même pour m/z 162 qui correspond à la même molécule associée à de l'eau.

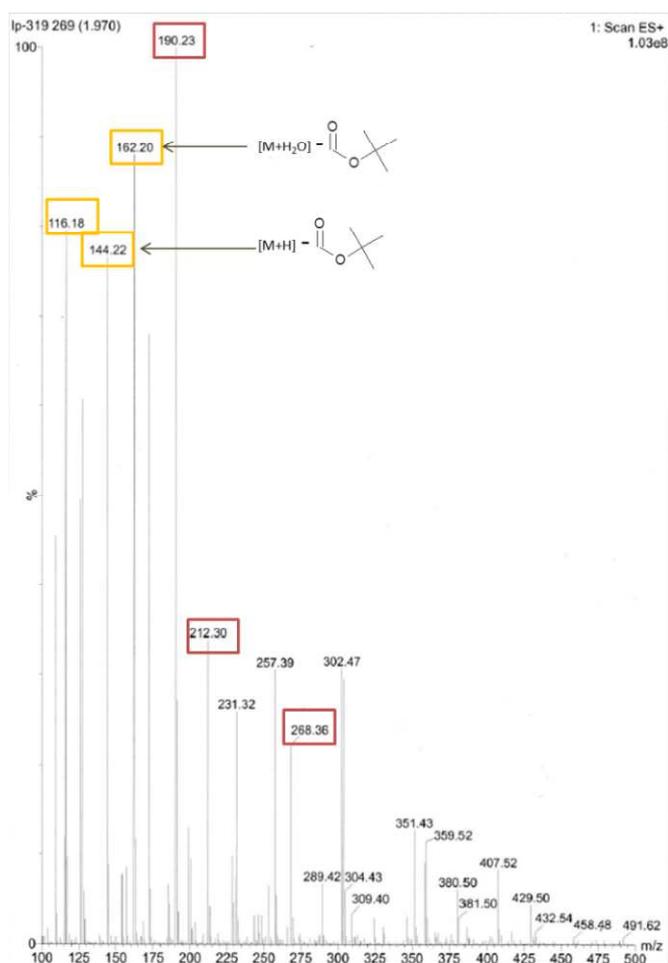


Figure 53 : Spectre de masse du pic à 1,97 min du chromatogramme du mélange.

Enfin le dernier échantillon donne un seul pic à 1,96 min et son spectre de masse est identique à celui du pic à 1,96 min de l'échantillon précédent. Le fait que les deux produits aient une masse identique montre que ce sont les mêmes produits. Les différents fragments permettent aussi de montrer qu'il s'agit bien de la même molécule.

L'ensemble de ces résultats nous permet de dire que le second produit qui apparaît lors de la réaction en présence de la β -Lg correspondait bien au composé *Cis*-formamide, et les deux pics présents en HPLC-Chirale correspondent à ses deux énantiomères.

Tous les complexes de palladium ont également été utilisés pour catalyser la condensation du pivalaldéhyde et du tert-butyloxyacétate, bien qu'avec des conversions plus faibles par rapport aux premiers substrats (**9a** et **10a**). Encore une fois, les 3 complexes de palladium à pinces avec des groupes OH (**7-pe⁺**-**7se⁺**) ont donné des conversions beaucoup plus faibles que les trois autres complexes. Dans presque tous les cas, seul le produit *Trans*-formamide a été obtenu sauf dans le cas du complexe **7-pc⁺**. En ajoutant la β -Lg, le rapport

diastéréoisomérique a nettement changé. En effet, une proportion significative de produit *Cis* a été obtenue. Le *Cis*-formamide était même le produit principal lorsque les hybrides β -Lg \subset **7-le⁺**, β -Lg \subset **7-pe⁺** ou β -Lg \subset **7-se⁺** ont été utilisés comme catalyseurs.

Tableau 5 : Réactivité des complexes 7 sur la condensation d'aldol entre 9c et 10c.

Entrée	β -Lg (mol%)	Complex (10mol%)	Conversion (%) ^a	<i>Trans/Cis</i> ^a
1	0	0	0	-
2	0	Pd(OAc) ₂	60	100/0
3	0	7-pa⁺	44	100/0
4	10	7-pa⁺	9	85/15
5	10 ^d	7-pa⁺	10	83/17
6	0	7-pb⁺	28	100/0
7	10	7-pb⁺	20	71/29
8	0	7-pc⁺	16	50/50
9	10	7-pc⁺	20	54/46
10	0	7-pe⁺	5	100/0
11	10	7-pe⁺	13	11/89
12	0	7-le⁺	11	100/0
13	10	7-le⁺	17	39/61
14	0	7-se⁺	5	100/0
15	10	7-se⁺	7	0/100

a) conversion obtenue après 3 jours à température ambiante, le rapport est déterminé par HPLC sur Kromasil 5-cellucoat, avec hexane/isopropanol 98/2 pendant 19 min puis à 96/4 pendant 11 min à 1 mL/min.

Cette série de catalyseurs supramoléculaires (métalloenzymes artificielles) a donné des conversions légèrement plus élevées que les complexes organométalliques seuls et la proportion de produit *Cis* augmente avec la longueur de la chaîne aliphatique. Une telle inversion de la diastéréosélectivité peut avoir été induite par l'environnement protéique formant la seconde sphère de coordination qui favorise l'attaque de l'aldéhyde d'un côté de l'énolate lié au métal incorporé dans la protéine. Alternativement, le complexe métallique peut être forcé par l'hôte protéique à adopter une seule configuration comme suggéré par les études de docking et la diastéréosélectivité est transférée ultérieurement au produit de réaction. Néanmoins, le fait que seule une diastéréosélectivité soit induite et non une énantiosélectivité, laisse à penser que la protéine n'induit pas la formation d'un complexe de Pd énantiomériquement pur mais son racémique.

Dans la série des catalyseurs au palladium, le composé **7-pc⁺** se comporte de manière anormale puisqu'il conduit à un mélange équimolaire d'isomères *Cis* et *Trans* et l'addition de β -Lg n'a eu aucune influence sur le résultat de la réaction, ce qui implique que ce complexe ne se lie probablement pas (ou mal) à la protéine. Le fait qu'aucun changement ne soit induit avec la protéine valide une nouvelle fois l'hypothèse que ces complexes **7-pc⁺** ne s'insèrent pas dans la protéine.

On s'est ensuite intéressé à l'énantiosélectivité de la réaction, malheureusement aucun des complexes de palladium **7⁺** ne permet pas d'observer un excès énantiomérique que ce soit pour la forme *Cis* ou *Trans* du formamide.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, on constate que la sélectivité est bien amenée par la seconde sphère de coordination fournie par la protéine. De plus, cette sélectivité menant à former le produit *Cis* augmente avec la stabilité du complexe dans la protéine, en effet avec les complexes **7-pa⁺** et **7-pb⁺** insérés dans la protéine on a un début de formation du *Cis* – formamide et avec les complexes **7-le⁺**, **7-pe⁺** et **7-se⁺** qui sont plus stables dans la protéine on constate une véritable influence de la β -Lg sur la réaction notamment avec le complexe **7-se⁺** qui ne forme que le *Cis* – formamide. Néanmoins le fait que l'on n'ait toujours pas d'énantiosélectivité pour cette réaction laisse à penser que la position dans la protéine n'est pas suffisamment contrainte pour permettre de déplacer l'équilibre vers la formation d'un catalyseur hybride unique.

Cependant pour ce type de réaction de condensation d'aldol, il a été montré que les sels d'argent pouvaient être actifs. Comme l'obtention des complexes de palladium cationiques **7⁺** se fait en présence d'AgBF₄, il est donc possible que l'on ait un reste de sels d'argent même

après traitement. Afin d'éviter la formation de sel d'argent une autre technique a été employée pour synthétiser les complexes cationiques 7^+ . Pour se faire l' AgBF_4 est remplacé par le TMSOTf (Schéma 29). De cette manière le complexe cationique 7^+ est aussi obtenu sans sels d'argent.²⁸ Un test avec ce catalyseur a été réalisé et comme on peut le voir dans l'entrée 5 du Tableau 5, aucun changement de réactivité ni de sélectivité n'est observé par rapport au résultat précédent. Il semble donc que s'il reste des sels d'argent ceux-ci n'ont pas d'influence sur la réaction.

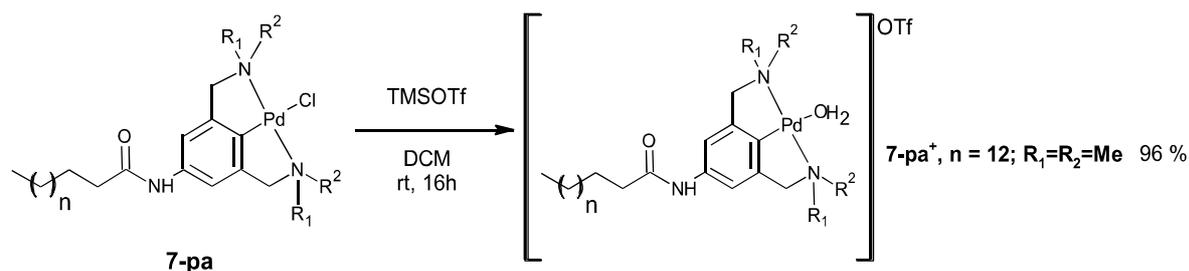


Schéma 29 : Formation du complexe cationique par le TMSOTf.

5. Etudes du mécanisme

Les études mécanistiques menées par les groupes de van Koten⁵⁰ et Szabó⁵⁵ ont montré que le mécanisme des réactions de condensation d'aldol catalysées par un complexe à pinces est fortement influencé par les propriétés électroniques des bras latéraux. L'insertion de l'isocynoacétate dans la liaison Pd-C des complexes cyclopalladés a été largement étudiée.⁵⁶ En fait, on a rapporté que les complexes à pince de palladium NCN et SCS⁵⁷ subissent une réaction d'insertion lors du traitement avec deux équivalents d'un isocynoacétate, formant un produit comme indiqué dans le schéma 30.⁵⁸ Ce complexe comprend deux molécules de méthyl isocynoacétate, une insérée dans la liaison (aryl) C-Pd, qui est ainsi convertie en une fraction imidoyl-palladium, et la seconde C-coordonnée au Pd, laissant l'un des ligands amino de l'ancien NCN non coordonné. Le produit d'insertion a été précipité et a été isolé avec un rendement de 80%. À notre connaissance, ces complexes insérés n'ont pas été testés comme catalyseurs potentiels.

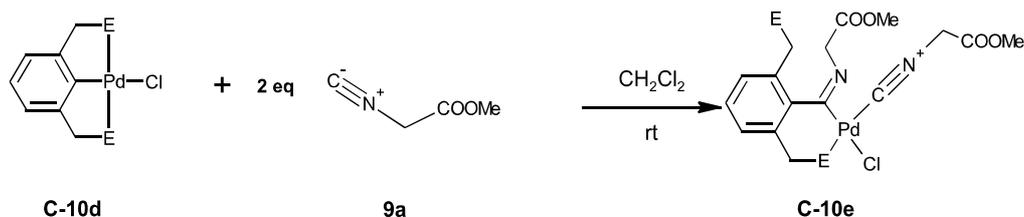


Schéma 30 : Insertion de **9a** dans un complexe NCN.

Il a été aussi montré que dans le cas des complexes NCN aqua en présence d'un seul équivalent d'isocynoacétate, celui-ci déplace la molécule d'eau et permet sa coordination au palladium. Cependant lorsqu'un excès d'isocynoacétate est ajouté l'insertion dans la liaison Pd-C se fait et un deuxième isocynoacétate peut se coordonner au palladium.⁵⁹ Les complexes NCN subissent alors une insertion de **9a** dans la liaison Pd-C pour former des composés à cycle cyclopalladé à six chaînons à base d'imidoylo.

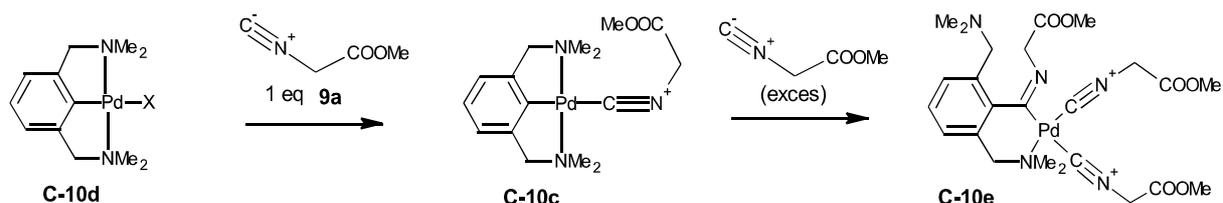


Schéma 31: Insertion de l'isocynoacétate dans le complexe NCN aqua.

Tandis que les complexes NCN **C-10c** et SCS **C-11c** subissent une réaction d'insertion avec le méthyl isocynoacétate, le complexe [PdCl (PCP)] **C-10b** ne le fait pas. Au lieu de cela, le ligand halogénure est déplacé par le méthyl isocynoacétate pour former un complexe cationique. Les produits d'insertion ont déjà été caractérisés et sont maintenant testés comme catalyseurs dans la réaction du benzaldéhyde avec le méthyl isocynoacétate. Dans le cas des complexes PCP **C-10b** possédant des bras latéraux π -accepteur, le groupe isocynoacétate se coordonne étroitement au palladium (**C-10c**) sans affecter l'intégrité de la structure du complexe à pince. En effet, aucune autre insertion de ce genre n'a été observée dans le cas des complexes à pinces PCP, ce qui suggère que la liaison est plus forte pour les substituants phosphorés par rapport à celle des groupements NMe₂ et SPh dans les complexes à pinces NCN et SCS. Seul le remplacement de l'anion chlorure dans le cas du complexe neutre PCP

palladium chlorure ou du ligand MeCN dans le cas d'un complexe cationique PCP a été observé ⁵⁵. Fait intéressant, la liaison Pt-C du complexe à pince NCN de platine subit également la même réaction d'insertion lorsqu'il réagit avec t-BuNC pour donner le produit d'insertion imidoyl-platine (II) correspondant.⁴⁶ La capacité de donneur plus forte des phosphores (par rapport à NMe₂ et SPh et à celle de l'anion d'halogénure et du méthylisocynoacétate coordonné) dans les complexes de palladium à pince PCP la nature tridentée du ligand à pince est conservé tout au long de la réaction catalytique aucune insertion supplémentaire de méthylisocynoacétate n'est observé. En fait, dans ce cas, l'excès d'isocynoacétate est capable de déplacer le ligand d'halogénure entraînant la formation du catalyseur réel. En conséquence, les complexes de PCP **C-10-c** sont des catalyseurs directs aux réactions d'aldol avec des isocyanures, tandis que pour les complexes de pinces NCN les précurseurs seront les catalyseurs **C-10-e**.

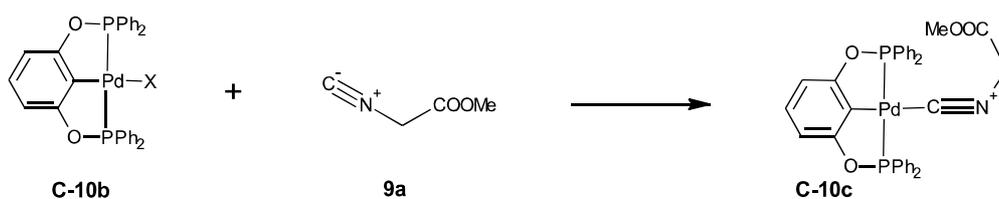


Schéma 32 : Réaction de 9a avec un complexe à pince PCP.

Ces résultats montrent que les complexes d'insertion B (voir Figure 54) formés à partir des complexes de palladium NCN cationiques avec l'isocynoacétate sont les catalyseurs réels pour la condensation d'aldol (réaction 1). Alors que, pour les catalyseurs à pince PCP de palladium, un cycle catalytique impliquant C en tant qu'intermédiaire clé a été proposé, les résultats actuels montrent que pour les catalyseurs au palladium à pince NCN, un cycle différent doit être pris en considération. Un cycle catalytique a été proposé (Figure 54). Les complexes cationiques $[\text{Pd}(\text{NCN})(\text{H}_2\text{O})](\text{BF}_4)$ (A) subissent l'insertion de l'isocynoacétate pour former l'espèce catalytique active B. Dans les espèces insérées, les sites vacants sont occupés par une autre molécule d'isocynoacétate. Les hydrogènes en α de la molécule méthylisocynoacétate coordonnée sont activés et peuvent être déprotonés par une base externe ou par une base interne (un substituant Me₂NCH₂) pour former un carbanion (C) en équilibre avec l'énolate (D). L'attaque nucléophile de ce carbanion sur le carbone de l'aldéhyde crée alors la nouvelle liaison C-C (produits thréo ou érythro). Par la suite,

l'oxygène de l'alcoolate résultant (E) vient attaquer le carbone relié au palladium afin de former le cycle oxazoline (F) coordonné au Pd. L'oxazoline est ensuite libérée et sera transformée en formamide assez rapidement dû à la présence de l'eau.

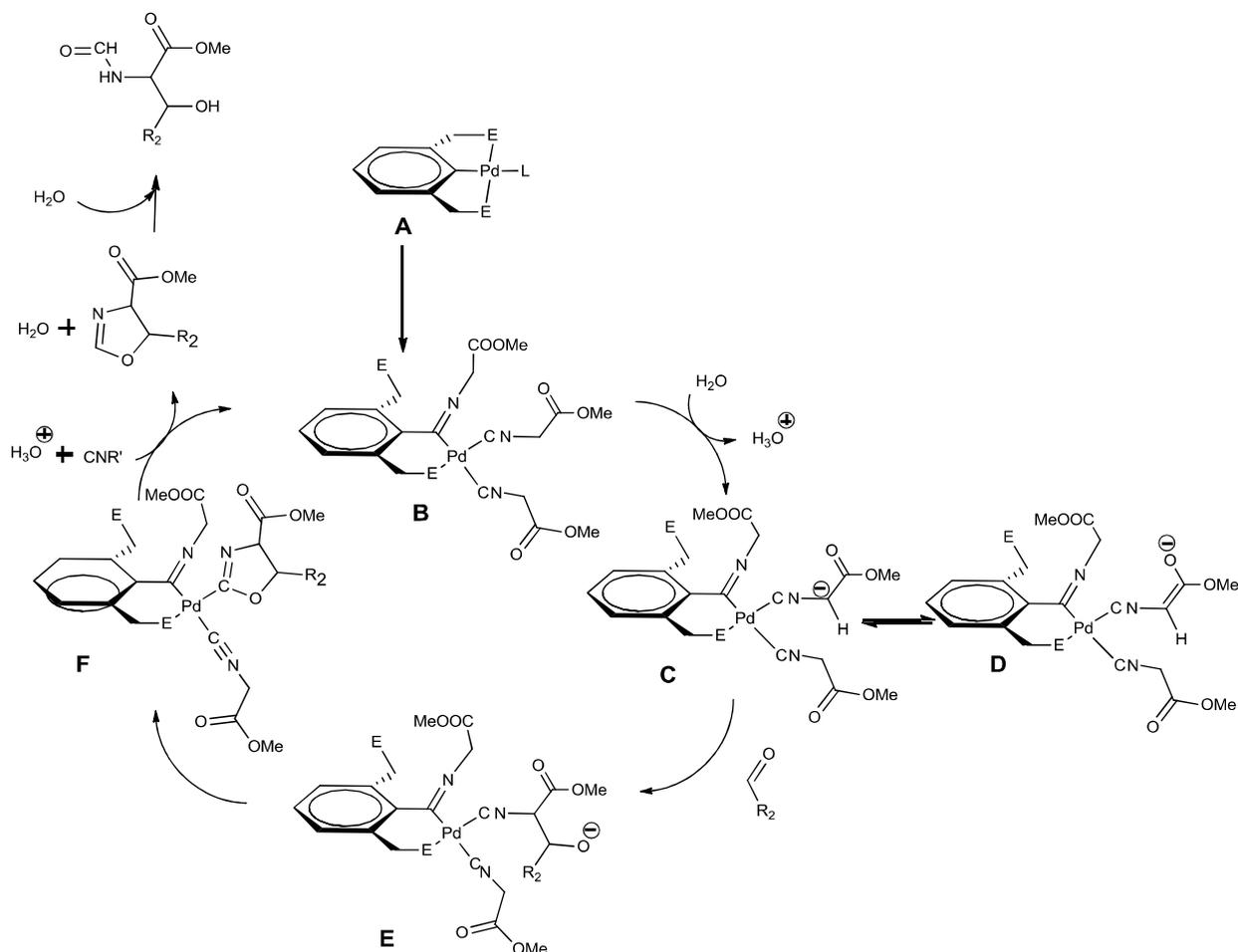


Figure 54 : Mécanisme de réaction

Le produit oxazoline (*Cis* ou *Trans*) est libéré lors de la protonation, ce qui rend la réaction catalytique. À ce stade, le catalyseur peut commencer un autre cycle avec la coordination d'un nouveau isocyanure. Dans le cas où une base externe est absente, le bras amino libre du complexe d'insertion NCN peut également fonctionner comme une base interne.⁶⁰ Le fait que des complexes d'insertion d'isocyanure soient formés dans ces réactions et qu'ils soient les catalyseurs réels peut aider à expliquer ces observations. Lors de la formation d'un complexe d'insertion, la symétrie C_2 du complexe à pince initiale est perdue et seul un des bras donneurs des pinces reste coordonné au métal central, ce qui donne une symétrie C_1 générale. Le fait qu'habituellement les ee les plus élevés soient observés avec les complexes à pince PCP

corroborent cette explication, car, dans ce cas, aucune réaction d'insertion n'a lieu et la symétrie C_2 du catalyseur n'est pas altérée.⁴⁷

La sélectivité vis-à-vis de la formation du produit *Trans* est probablement contrôlée cinétiquement^{61,62} En termes de sélectivité du produit, il semble généralement que plus la réaction est rapide, moins elle est sélective pour le produit *Trans*. On peut supposer que le produit *Cis* est le produit cinétique alors que le produit *Trans* est le produit thermodynamique. Cette sélectivité est déterminée au stade où l'énolate C^- dans l'intermédiaire **C** lors de l'attaque de l'aldéhyde pour former un produit érythro ou thréo générant des liaisons C-C. Le fait est que l'étape déterminante de la sélectivité menant au produit *Cis* ou *Trans* est déterminée à ce stade.

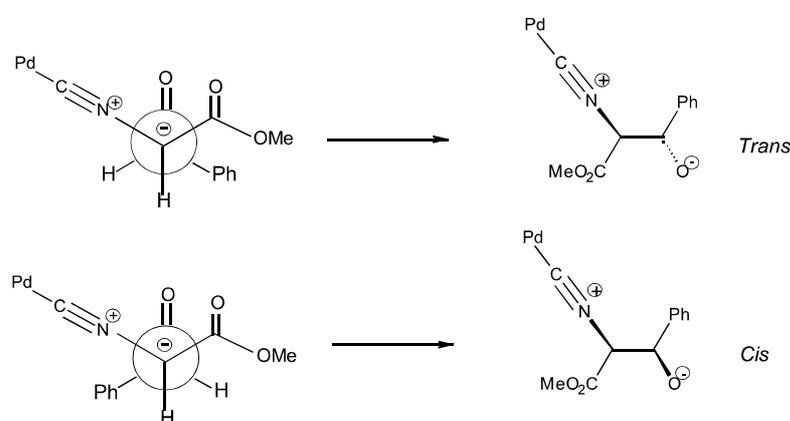


Figure 55 : différentes approches possibles.

IX. Conclusions et perspectives.

Pour conclure, nous avons synthétisé et caractérisé plusieurs nouveaux complexes à pince de palladium (II) à partir de ligands hémilabiles et nous avons pu étudier leurs propriétés structurales. Les études par RMN 1H ont montré qu'en solution, les complexes **7-pb** et **7-pc** existent sous forme de mélanges de diastéréoisomères avec des rapports diastéréomères de 61:39 et 56:44, respectivement. En outre, l'hémilabilité a pu être constatée avec l'échange *Cis* / *Trans* accéléré par chauffage. Les expériences de dichroïsme circulaire ont suggéré que l'insertion de certains des complexes à pinces dans la cavité de la β -lactoglobuline s'est produite. Cette hypothèse a été bien confirmée par des simulations de docking moléculaires. Malheureusement, aucune preuve de l'influence de la structure tertiaire de la protéine sur la

configuration du complexe **7-pb** n'a été révélée par spectroscopie de dichroïsme circulaire, probablement en raison des mauvaises propriétés chromophores des composés.

La synthèse des nouveaux complexes hydroxylés **7-le**, **7-pe** et **7-se** a permis une meilleure insertion de ceux-ci dans la protéine grâce à la formation de liaisons hydrogène supplémentaires. Dans ce cas, une preuve de l'influence de la structure tertiaire de la protéine sur la configuration du complexe **7-pb** a été attestée par des expériences de CD, et même le calcul d'une constante d'affinité obtenue par fluorescence.

Néanmoins, même si aucune preuve d'adaptabilité des complexes au sein de la protéine n'a pu être démontrée, toutes les constructions de métalloprotéines artificielles ont montré qu'elles catalysent les réactions de condensation d'aldol entre les isocyanoacétates et les aldéhydes pour donner des précurseurs de β -hydroxyaminoacides. La diastéréosélectivité inhabituelle vis-à-vis du produit *Cis* a été trouvée lors de la combinaison de la β -LG et des complexes de pinces portant des substituants OH.

En perspective, il est possible d'envisager de réaliser des mutations au niveau de la protéine afin de voir l'influence de la seconde sphère de coordination sur la sélectivité de la réaction. En effet, une mutation des acides aminés de la protéine se trouvant à l'entrée de la cavité du β -barrel pourrait permettre l'obtention d'un changement au niveau de la sélectivité.

X. Bibliographie

- (1) Moulton, C. J.; Shaw, B. L. Transition Metal–carbon Bonds. Part XLII. Complexes of Nickel, Palladium, Platinum, Rhodium and Iridium with the Tridentate Ligand 2,6-Bis[(di-*t*-Butylphosphino)methyl]phenyl. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1976**, No. 11, 1020–1024.
- (2) Koten, G. van; Timmer, K.; Noltes, J. G.; Spek, A. L. A Novel Type of Pt–C Interaction and a Model for the Final Stage in Reductive Elimination Processes Involving C–C Coupling at Pt; Synthesis and Molecular Geometry of [1,N,N'- η -2,6-Bis{(dimethylamino)methyl}-toluene]iodoplatinum(II) Tetrafluoroborate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, No. 6, 250–252.
- (3) van Koten, G.; Jastrzebski, J. T. B. H.; Noltes, J. G.; Spek, A. L.; Schoone, J. C. Triorganotin Cations Stabilized by Intramolecular Sn–N Coordination; Synthesis and Characterization of {C,N,N'-2,6-Bis[(dimethylamino)methyl]phenyl}diorganotin Bromides. *J. Organomet. Chem.* **1978**, *148* (3), 233–245.
- (4) Felluga, F.; Baratta, W.; Fanfoni, L.; Pitacco, G.; Rigo, P.; Benedetti, F. Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Chiral Pincer Ligands. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (9), 3547–3550.
- (5) Omae, I. Intramolecular Five-Membered Ring Compounds and Their Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248* (11), 995–1023.
- (6) Selander, N.; J. Szabo?, K. Catalysis by Palladium Pincer Complexes. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (3), 2048–2076.
- (7) Morales-Morales, D. Pincer Complexes: Applications in Catalysis. *Rev. Soc. Quím. México* **2004**, *48* (4), 338–346.
- (8) Koten, G. van; Gebbink, R. J. M. (Bert) K. The Monoanionic Pincer–metal Platform: A Scaffold for Meeting Challenges in Catalysis and Materials Research. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (35), 8731–8732.
- (9) Boom, M. E. V. D.; Kraatz, H. B.; Ben-David, Y.; Milstein, D. Activation of a Non-Strained C–C Bond with platinum(II). *Chem. Commun.* **1996**, No. 18, 2167–2168.
- (10) Van Beek, J. A. M.; Van Koten, G.; Ramp, M. J.; Coenjaarts, N. C.; Grove, D. M.; Goubitz, K.; Zoutberg, M. C.; Stam, C. H.; Smeets, W. J. J.; Spek, A. L. Influence of the Amino Substituents of Potentially Bis Ortho Chelating Aryl Ligands (2,6-{R₁R₂NCH₂}₂C₆H₃)- on the Synthesis and Properties of Their organonickel(II) Complexes. *Inorg. Chem.* **1991**, *30* (15), 3059–3068.
- (11) Herrera-Álvarez, C.; Gómez-Benítez, V.; Redón, R.; García, J. J.; Hernández-Ortega, S.; Toscano, R. A.; Morales-Morales, D. [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]palladium(II) Complexes with Fluorinated Benzenethiolate Ligands: Examination of the Electronic Effects in the Solid State, Solution and in the Pd-Catalyzed Heck Reaction with the Catalytic System [Pd(dppf)(SRF)₂]. *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689* (15), 2464–2472.
- (12) Gagliardo, M.; Selander, N.; Mehendale, N. C.; van Koten, G.; Klein Gebbink, R. J. M.; Szabó, K. J. Catalytic Performance of Symmetrical and Unsymmetrical Sulfur-Containing Pincer Complexes: Synthesis and Tandem Catalytic Activity of the First PCS-Pincer Palladium Complex. *Chem. – Eur. J.* **2008**, *14* (16), 4800–4809.
- (13) Kruithof, C. A.; Casado, M. A.; Guillena, G.; Egmond, M. R.; van der Kerk-van Hoof, A.; Heck, A. J. R.; Klein Gebbink, R. J. M.; van Koten, G. Lipase Active-Site-Directed Anchoring of Organometallics: Metallopincer/Protein Hybrids. *Chem. – Eur. J.* **2005**, *11* (23), 6869–6877.

- (14) Kruithof, C. A.; Dijkstra, H. P.; Lutz, M.; Spek, A. L.; Egmond, M. R.; Klein Gebbink, R. J. M.; van Koten, G. Non-Tethered Organometallic Phosphonate Inhibitors for Lipase Inhibition: Positioning of the Metal Center in the Active Site of Cutinase. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, *2008* (28), 4425–4432.
- (15) Filice, M.; Romero, O.; Aires, A.; Guisan, J. M.; Rumbero, A.; Palomo, J. M. Preparation of an Immobilized Lipase-Palladium Artificial Metalloenzyme as Catalyst in the Heck Reaction: Role of the Solid Phase. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (12), 2687–2696.
- (16) Pierron, J.; Malan, C.; Creus, M.; Gradinaru, J.; Hafner, I.; Ivanova, A.; Sardo, A.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes for Asymmetric Allylic Alkylation on the Basis of the Biotin–Avidin Technology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (4), 701–705.
- (17) Ueno, T.; Suzuki, M.; Goto, T.; Matsumoto, T.; Nagayama, K.; Watanabe, Y. Size-Selective Olefin Hydrogenation by a Pd Nanocluster Provided in an Apo-Ferritin Cage. *Angew. Chem.* **2004**, *116* (19), 2581–2584.
- (18) Robertson, N.; Jiang, L.; Ramage, R. Racemisation Studies of a Novel Coupling Reagent for Solid Phase Peptide Synthesis. *Tetrahedron* **1999**, *55* (9), 2713–2720.
- (19) Travaglini, L.; Bridgland, L. N.; Davis, A. P. Cholanamide Components for Organic Alloys; Expanding the Scope of Nanoporous Steroidal Ureas. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (37), 4803–4805.
- (20) Chatt, J.; Davidson, J. M. 154. The Tautomerism of Arene and Ditertiary Phosphine Complexes of Ruthenium (0), and the Preparation of New Types of Hydrido-Complexes of Ruthenium (II). *J. Chem. Soc. Resumed* **1965**, 843–855.
- (21) Crespo, M.; Anderson, C. M.; Kfoury, N.; Font-Bardia, M.; Calvet, T. Reductive Elimination from Cyclometalated Platinum(IV) Complexes To Form C_{sp²}?C_{sp³} Bonds and Subsequent Competition between C_{sp²}?H and C_{sp³}?H Bond Activation. *Organometallics* **2012**, *31* (12), 4401–4404.
- (22) Albrecht, M. Cyclometalation Using D-Block Transition Metals: Fundamental Aspects and Recent Trends. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (2), 576–623.
- (23) Bergbreiter, D. E.; Osburn, P. L.; Liu, Y.-S. Tridentate SCS Palladium(II) Complexes: New, Highly Stable, Recyclable Catalysts for the Heck Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (41), 9531–9538.
- (24) Kruithof, C. A.; Dijkstra, H. P.; Lutz, M.; Spek, A. L.; Gebbink, R. J. M. K.; van Koten, G. X-Ray and NMR Study of the Structural Features of SCS-Pincer Metal Complexes of the Group 10 Triad. *Organometallics* **2008**, *27* (19), 4928–4937.
- (25) Weng, W.; Yang, L.; Foxman, B. M.; Ozerov, O. V. Chelate-Enforced Phosphine Coordination Enables α -Abstraction to Give Zirconium Alkylidenes. *Organometallics* **2004**, *23* (20), 4700–4705.
- (26) Bailey, B. C.; Huffman, J. C.; Mindiola, D. J.; Weng, W.; Ozerov, O. V. Remarkably Stable Titanium Complexes Containing Terminal Alkylidene, Phosphinidene, and Imide Functionalities. *Organometallics* **2005**, *24* (7), 1390–1393.
- (27) Soro, B.; Stoccoro, S.; Minghetti, G.; Zucca, A.; Cinellu, M. A.; Gladiali, S.; Manassero, M.; Sansoni, M. Synthesis of the First C-2 Cyclopalladated Derivatives of 1,3-Bis(2-Pyridyl)benzene. Crystal Structures of [Hg(N-C-N)Cl], [Pd(N-C-N)Cl], and [Pd₂(N-C-N)₂(?-OAc)₂[Hg₂Cl₆]. Catalytic Activity in the Heck Reaction. *Organometallics* **2005**, *24* (1), 53–61.
- (28) Mehendale, N. C.; Bezemer, C.; van Walree, C. A.; Klein Gebbink, R. J. M.; van Koten, G. Novel Silica Immobilized NCN-Pincer palladium(II) and platinum(II) Complexes: Application as Lewis Acid Catalysts. *J. Mol. Catal. Chem.* **2006**, *257* (1), 167–175.

- (29) Grove, D. M.; Van Koten, G.; Louwen, J. N.; Noltes, J. G.; Spek, A. L.; Ubbels, H. J. C. Trans-2,6-Bis[(dimethylamino)methyl]phenyl-N,N',C Complexes of palladium(II) and platinum(II). Crystal Structure of [PtI[MeC₆H₃(CH₂NMe₂)₂-o,o']BF₄: A Cyclohexadienyl Carbonium Ion with a σ -Bonded Metal Substituent. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104* (24), 6609–6616.
- (30) Kelly, S. M.; Price, N. C. The Application of Circular Dichroism to Studies of Protein Folding and Unfolding. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1338* (2), 161–185.
- (31) Viseu, M. I.; Carvalho, T. I.; Costa, S. M. B. Conformational Transitions in β -Lactoglobulin Induced by Cationic Amphiphiles: Equilibrium Studies. *Biophys. J.* **2004**, *86* (4), 2392–2402.
- (32) Collini, M.; D'Alfonso, L.; Molinari, H.; Ragona, L.; Catalano, M.; Baldini, G. Competitive Binding of Fatty Acids and the Fluorescent Probe 1-8-Anilinonaphthalene Sulfonate to Bovine β -Lactoglobulin. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2003**, *12* (8), 1596–1603.
- (33) Cherrier, M. V.; Engilberge, S.; Amara, P.; Chevalley, A.; Salmain, M.; Fontecilla-Camps, J. C. Structural Basis for Enantioselectivity in the Transfer Hydrogenation of a Ketone Catalyzed by an Artificial Metalloenzyme. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, *2013* (21), 3596–3600.
- (34) Loch, J. I.; Bonarek, P.; Polit, A.; Riès, D.; Dziedzicka-Wasylewska, M.; Lewiński, K. Binding of 18-Carbon Unsaturated Fatty Acids to Bovine β -lactoglobulin—Structural and Thermodynamic Studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *57*, 226–231.
- (35) Ansari, M. S.; Rama, N. H.; Hussain, M. T.; Raza, A. R. Diastereotopy in Some 3,4-Dihydroisocoumarins — Effect of Changing the Substituents on the Chiral Centre. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2000**, *56* (7), 1385–1389.
- (36) Lange, D. C.; Kothari, R.; Patel, R. C.; Patel, S. C. Retinol and Retinoic Acid Bind to a Surface Cleft in Bovine Beta-Lactoglobulin: A Method of Binding Site Determination Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Biophys. Chem.* **1998**, *74* (1), 45–51.
- (37) Narayan, M.; Berliner, L. J. Fatty Acids and Retinoids Bind Independently and Simultaneously to β -Lactoglobulin. *Biochemistry (Mosc.)* **1997**, *36* (7), 1906–1911.
- (38) Albani, J. R.; Vogelaer, J.; Bretesche, L.; Kmiecik, D. Tryptophan 19 Residue Is the Origin of Bovine β -Lactoglobulin Fluorescence. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *91*, 144–150.
- (39) Sawyer, L.; Brownlow, S.; Polikarpov, I.; Wu, S.-Y. β -Lactoglobulin. *Int. Dairy J.* **1998**, *8* (2), 65–72.
- (40) Cogan, U.; Kopelman, M.; Mokady, S.; Shinitzky, M. Binding Affinities of Retinol and Related Compounds to Retinol Binding Proteins. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *65* (1), 71–78.
- (41) Compagnini, A.; Fisichella, S.; Foti, S.; Maccarrone, G.; Saletti, R. Isolation by Gel-Permeation Chromatography of a Non-Covalent Complex of Cibacron Blue F3G-A with Human Serum Albumin. *J. Chromatogr. A* **1996**, *736* (1), 115–123.
- (42) Vogl, J.; Heumann, K. G. Determination of Heavy Metal Complexes with Humic Substances by HPLC/ICP-MS Coupling Using on-Line Isotope Dilution Technique. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *359* (4–5), 438–441.
- (43) Castellano, R. K.; Rebek, J. Formation of Discrete, Functional Assemblies and Informational Polymers through the Hydrogen-Bonding Preferences of Calixarene Aryl and Sulfonyl Tetraureas. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (15), 3657–3663.
- (44) Choi, I. S.; Li, X.; Simanek, E. E.; Akaba, R.; Whitesides, G. M. Self-Assembly of Hydrogen-Bonded Polymeric Rods Based on the Cyanuric Acid·Melamine Lattice. *Chem. Mater.* **1999**, *11* (3), 684–690.

- (45) Silverman, R. B.; Bichler, K. A.; Leon, A. J. Unusual Mechanistic Difference in the Inactivation of γ -Aminobutyric Acid Aminotransferase by (E)- and (Z)-4-Amino-6-Fluoro-5-Hexenoic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (6), 1253–1261.
- (46) Gorla, F.; Togni, A.; Venanzi, L. M.; Albinati, A.; Lianza, F. Synthesis of an Optically Active Platinum(II) Complex Containing a New Tridentate P-C-P Ligand and Its Catalytic Activity in the Asymmetric Aldol Reaction of Methyl Isocyanoacetate. X-Ray Crystal Structure of [2,6-Bis[(1'S,2'S)-1'-(diphenylphosphino)-2',3'-O-Isopropylidene-2',3'-dihydroxypropyl]phenyl](η -1-nitrato)platinum(II). *Organometallics* **1994**, *13* (5), 1607–1616.
- (47) Longmire, J. M.; Zhang, X.; Shang, M. Synthesis and X-Ray Crystal Structures of Palladium(II) and Platinum(II) Complexes of the PCP-Type Chiral Tridentate Ligand (1R,1'R)-1,3-Bis[1-(Diphenylphosphino)ethyl]benzene. Use in the Asymmetric Aldol Reaction of Methyl Isocyanoacetate and Aldehydes. *Organometallics* **1998**, *17* (20), 4374–4379.
- (48) Motoyama, Y.; Kawakami, H.; Shimozone, K.; Aoki, K.; Nishiyama, H. Synthesis and X-Ray Crystal Structures of Bis(oxazolanyl)phenyl-Derived Chiral Palladium(II) and Platinum(II) and -(IV) Complexes and Their Use in the Catalytic Asymmetric Aldol-Type Condensation of Isocyanides and Aldehydes. *Organometallics* **2002**, *21* (16), 3408–3416.
- (49) Stark, M. A.; Richards, C. J. Synthesis and Application of Cationic 2,6-bis(2-oxazolanyl)phenylpalladium(II) Complexes. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (33), 5881–5884.
- (50) Gosiewska, S.; Martinez Herreras, S.; Lutz, M.; Spek, A. L.; Havenith, R. W. A.; van Klink, G. P. M.; van Koten, G.; Gebbink, R. J. M. K. Synthesis, Structure, and Catalytic Performance of Diastereopure Five-Coordinated NCN-Pincer Palladium(II) Complexes Bearing Bulky Amino Acid Substituents. *Organometallics* **2008**, *27* (11), 2549–2559.
- (51) Slagt, M. Q.; Jastrzebski, J. T. B. H.; Gebbink, R. J. M. K.; Ramesdonk, H. J. van; Verhoeven, J. W.; Ellis, D. D.; Spek, A. L.; Koten, G. van. Pyrenoxy-Based NCN-Pincer Palladium(II) Molecular Tweezers: Synthesis, Properties in Solution and Catalysis. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003* (9), 1692–1703.
- (52) Donkervoort, J. G.; Vicario, J. L.; Rijnberg, E.; Jastrzebski, J. T. B. H.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; van Koten, G. Formation of Mixed Aryl-, Alkyl-lithium Aggregates in the Heteroatom Assisted Lithiation of α,α' -Dialkyl Substituted 1,3-bis[(dimethylamino)methyl]benzene. *J. Organomet. Chem.* **1998**, *550* (1–2), 463–467.
- (53) Ohta, H.; Uozumi, Y.; Yamada, Y. M. A. Highly Active Copper-Network Catalyst for the Direct Aldol Reaction. *Chem. – Asian J.* **2011**, *6* (9), 2545–2549.
- (54) Sladojevich, F.; Trabocchi, A.; Guarna, A.; Dixon, D. J. A New Family of Cinchona-Derived Amino Phosphine Precatalysts: Application to the Highly Enantio- and Diastereoselective Silver-Catalyzed Isocyanoacetate Aldol Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (6), 1710–1713.
- (55) Aydin, J.; Kumar, K. S.; Eriksson, L.; Szabó, K. J. Palladium Pincer Complex-Catalyzed Condensation of Sulfonimines and Isocyanoacetate to Imidazoline Derivatives. Dependence of the Stereoselectivity on the Ligand Effects. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349* (17–18), 2585–2594.
- (56) Dupont, J.; Pfeffer, M.; Daran, J. C.; Jeannin, Y. Reactivity of Cyclopalladated Compounds. Part 17. Influence of the Donor Atom in Metallacyclic Rings on the Insertion of Tert-Butyl Isocyanide and Carbon Monoxide into Their Palladium-Carbon

- Bonds. X-Ray Molecular Structure of Cyclo-[Pd(.eta.-(CN)-.mu.-C(C₆H₄CH₂SMe):NBu-tert)Br]₂. *Organometallics* **1987**, *6* (4), 899–901.
- (57) Dupont, J.; Pfeffer, M. Reactions of Cyclopalladated Compounds. Part 24. Reactivity of the Pd–C Bond of Cyclopalladated Compounds towards Isocyanides and Carbon Monoxide. Role of the Donor Group. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1990**, No. 11, 3193–3198.
- (58) Mehendale, N. C.; Sietsma, J. R. A.; de Jong, K. P.; van Walree, C. A.; Gebbink, R. J. M. K.; van Koten, G. PCP- and SCS-Pincer Palladium Complexes Immobilized on Mesoporous Silica: Application in C=C Bond Formation Reactions. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349* (17–18), 2619–2630.
- (59) Schlenk, C.; Kleij, A. W.; Frey, H.; van Koten, G. Macromolecular-Multisite Catalysts Obtained by Grafting Diaminoaryl Palladium(ii) Complexes onto a Hyperbranched-Polytrialkylsilane Support. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39* (19), 3445–3447.
- (60) Ito, Y.; Sawamura, M.; Shirakawa, E.; Hayashizaki, K.; Hayashi, T. Asymmetric Aldol Reaction of α -Isocyanocarboxylates with Paraformaldehyde Catalyzed by Chiral Ferrocenylphosphine-gold(I) Complexes: Catalytic Asymmetric Synthesis of α -Alkylserines. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29* (2), 235–238.
- (61) Motoyama, Y.; Shimozone, K.; Aoki, K.; Nishiyama, H. Formation of Fischer Carbene Complexes in Asymmetric Aldol-Type Condensation of an Isocyanide Component on Bis(oxazolonyl)phenylrhodium(III) Complexes with Aldehydes: Stereochemistry, Structural Characterization, and Mechanistic Studies. *Organometallics* **2002**, *21* (8), 1684–1696.
- (62) Togni, A.; Pastor, S. D. Chiral Cooperativity: The Nature of the Diastereoselective and Enantioselective Step in the gold(I)-Catalyzed Aldol Reaction Utilizing Chiral Ferrocenylamine Ligands. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (5), 1649–1664.

XI. Materials

All reactions were performed in oven-dried glassware and under inert atmosphere. All starting materials, reagents, and catalysts were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Bovine β -lactoglobulin (mixture of isoforms A and B) was purchased from Sigma – Aldrich (ref L2506). Anhydrous tetrahydrofuran (THF) was obtained by Pure Solv™ Purification System. Analytical thin layer chromatography was performed with Merck silica gel 60F glass plates and flash chromatography by use of Merck silica gel 60 (230–400 mesh). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker AV400 and AV250. Chemical shifts (δ) are expressed as ppm referenced to the solvent residual signals (i.e. chloroform, ^1H δ 7.26 ppm, ^{13}C δ 77.2 ppm, dimethyl sulfoxide, ^1H δ 2.50 ppm, ^{13}C δ 39.5 ppm and methanol, ^1H δ 3.31 ppm, ^{13}C δ 49.0 ppm). Splitting patterns are expressed as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; p, pentet; m, multiplet; br, broad. High-resolution mass spectra (HRMS) are reported in m/z . Circular dichroism spectroscopy was carried out at 20 ± 0.1 °C on a J-815 CD spectrometer (Jasco). Near-uv CD spectra were recorded in a 1-cm pathlength quartz cell. The number of scans was set to 3 with a bandwidth of 1.0 nm and data pitch of 0.1 nm at scan speed of 50 nm/min. Far-uv CD spectra were recorded in a 2-mm pathlength quartz cell. The number of scans was set to 2 with a bandwidth of 1.0 nm and data pitch of 0.1 nm at scan speed of 20 nm/min. The resulting spectra were smoothed and baseline-corrected using the software provided with the CD spectrometer. Some product like the hydroxybenzotriazole 42 was prepared following the literature.^a

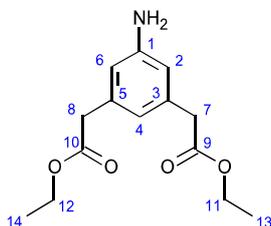
^a Katritzky, A. R.; Abdel-Fattah, A.; Wang, M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4932

^b Zheng, J.; Lin, S.; Jiang, B.-W.; Marder, T. B.; Yang, Z. *Can. J. Chem.*, **2012**, *90*, 138

^c Bergbreiter, D.; Osborn, P.L.; Liu, Y.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9531.

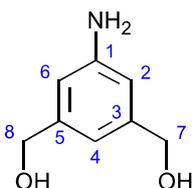
XII. Methods

1. Synthesis of diethyl 5-aminoisophthalate (2)^b



Thionyl chloride (3 mL, 4.91 g, 41.3 mmol) was added dropwise at 0 °C to a stirred suspension of 5-aminoisophthalic acid (2.5 g, 13.8 mmol) in absolute EtOH (20 mL). After addition, the reaction mixture was refluxed for 4 h and the solvent evaporated. The residue was dissolved in AcOEt (50 mL) and the resulting solution was treated with saturated NaHCO₃. The organic phase was separated, dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. Yield: 2.92 g (89%). ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 1.39 (t, J = 7 Hz, 6H, H_{13,14}), 4.35 (q, J = 7 Hz, 4H, H_{11,12}), 4.50 (s, 4H, H_{7,8}), 7.52 (d, J = 1 Hz, 2H, H_{2,6}), 7.88 (t, J = 1 Hz, 1H, H₄). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 14.7 (C_{13,14}), 62.4 (C_{11,12}), 70.3 (C_{7,8}), 120.0 (C_{2,6}), 120.5 (C₄), 132.9 (C_{3,5}), 150.3 (C₁), 167.9 (CO). ESI-HRMS (m/z): found: 238.1075 (M+H⁺); 260.0906 (M+Na⁺) (calc for C₁₂H₁₅NO₄: 237.1074 and for C₁₂H₁₅NNaO₄: 260.0893).

2. Synthesis of (5-amino-1,3-phenylene)dimethanol (3)^c



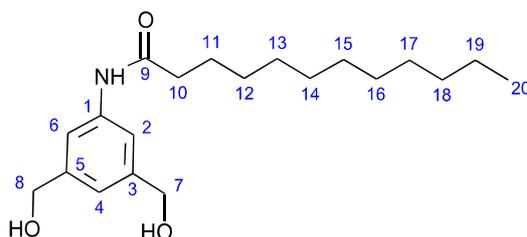
Diethyl 5-aminoisophthalate **1** (3 g, 12.6 mmol) was dissolved in absolute THF (70 mL) and lithium aluminum hydride was added portionwise to this solution at 0 °C. After the addition, the reaction mixture was refluxed for 6 h, then cooled to room temperature and stirred overnight. The reaction was quenched with aqueous solution of potassium hydroxide (20%, 7 mL); the resulting mixture was filtered through a pad of Celite. This pad was then washed with AcOEt (2 × 25 mL). The filtrate was dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. Yield: 1.84 g (96%). ¹H NMR (250 MHz, MeOD) δ ppm 4.50 (s, 4H, H_{7,8}), 6.64 (s, 2H, H_{2,6}),

^b Zheng, J.; Lin, S.; Jiang, B.-W.; Marder, T. B.; Yang, Z. *Can. J. Chem.*, **2012**, *90*, 138

^c Bergbreiter, D.; Osborn, P.L.; Liu, Y.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9531.

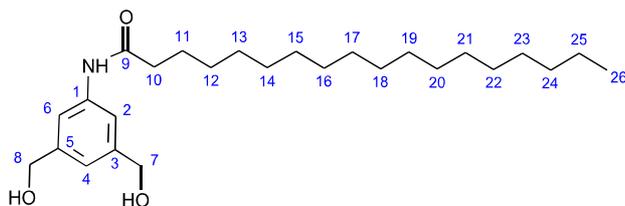
6.69 (s, 1H, H₄). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 65.3 (C_{7,8}), 114.1 (C_{2,6}), 116.5 (C₄), 143.6 (C_{3,5}), 148.8 (C₁). ESI-HRMS (m/z): found: 238.1075 (M+H⁺); 260.0906 (M+Na⁺) (calc for C₁₂H₁₆NO₄: 238.1074 and for C₁₂H₁₅NO₄Na: 260.0893). ESI-HRMS (m/z): found: 154.0859 (M+H⁺) (calc for C₈H₁₂NO₂: 154.0863).

3. Synthesis of N-(3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl)dodecanamide (4-l)



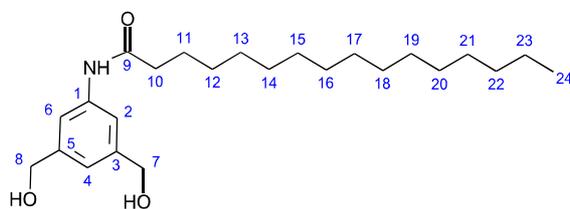
Lauric acid (396 mg, 1.98 mmol), *N*-hydroxybenzotriazole (101 mg, 0.75 mmol) and (5-amino-1,3-phenylene)dimethanol (**2**) (310 mg, 2 mmol) were dissolved in THF (20 mL). The resulting solution was cooled to 0°C and a solution of EDCI (378 mg, 1.98 mmol) in DMF (3 mL) was added. The resulting mixture was refluxed for 24 h. Then, water was added; the precipitate was filtered off and dried. Yield: 540 mg (81%). Mp: 76 °C. ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.79 (t, *J* = 6 Hz, 3H, H₂₀), 1.19 (m, 16H, H₁₂₋₁₉), 1.59 (m, 2H, H₁₁), 2.26 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H₁₀), 4.48 (s, 4H, H_{7,8}), 7.00 (s, 1H, H₄), 7.37 (s, 2H, H_{2,6}), 9.56 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 14.8 (C₂₀), 24.1 (C₁₁), 26.1, 27.3, 30.7, 30.8, 31.1, 33.4, 35.1 (C₁₂₋₁₉), 38.4 (C₁₀), 65.4 (C_{7,8}), 119.1 (C_{2,6}), 122.4 (C₄), 140.4 (C_{3,5}), 144.0 (C₁), 175.1 (CO). IR (ν , cm⁻¹): 3257 (ν OH), 2920 (ν C-H), 1653 (ν C=O), 1541 (ν N-H), 1456 (ν C=C), 850 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 358.2361 (M+Na⁺) (calc for C₂₀H₃₃NNaO₃: 358.2353).

4. Synthesis of N-(3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl)stearamide (4-s)



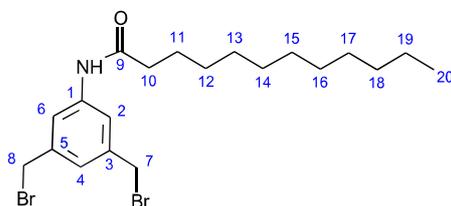
Stearoyl chloride (453 mg, 1.5 mmol), sodium hydrogenocarbonate (378 mg, 4.5 mmol) and (5-amino-1,3-phenylene)dimethanol (**2**) (232 mg, 1.5 mmol) were dissolved in THF (10 mL), the resulting solution was refluxed for 16 h. Then, the reaction mixture was poured into water; the precipitate was filtered off and dried. Yield: 550 mg (87%). Mp: 114°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d^6) δ ppm 0.85 (t, $J = 7$ Hz, 3H, H₂₆), 1.23 (m, 28H, H₁₂₋₂₅), 1.57 (m, 2H, H₁₁), 2.27 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H₁₀), 4.44 (s, 4H, H_{7,8}), 6.43 (s, 1H, C₄), 7.43 (s, 2H, C_{2,6}), 9.76 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d^6) δ ppm 14.4 (C₂₆), 22.6 (C₁₁), 25.7, 28.7, 29.2, 29.6, 31.8, 32.5 (C₁₂₋₂₅), 36.9 (C₁₀), 63.5 (C_{7,8}), 116.0 (C_{2,6}), 119.5 (C₄), 139.5 (C_{3,5}), 143.2 (C₁), 171.5 (CO). IR (ν , cm⁻¹): 3334 (ν_{OH}), 2910 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1722 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1546 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1468 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1188 ($\nu_{\text{C-N}}$), 867 ($\nu_{\text{C-C}}$). ESI-HRMS (m/z): found: 442.3279 (M+Na⁺) (calc for C₂₆H₄₅NO₃Na: 442.3292).

5. Synthesis of N-[3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl]hexadecanamide (4-p)³



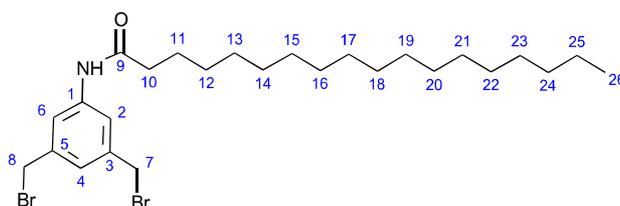
(5-Amino-1,3-phenylene)dimethanol (**2**) (294 mg, 1.92 mmol) and 1-palmitoyl-1H-1,2,3-benzotriazole (686 mg, 1.92 mmol) were dissolved in THF (10 mL) and the resulting solution was refluxed for 48 h. Then, the solvent was evaporated and the residue was recrystallized from EtOH. Yield: 556 mg (74%). Mp: 102 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d^6) δ ppm 0.85 (t, $J = 7$ Hz, 3H, H₂₄), 1.24 (m, 24H, H₁₂₋₂₃), 1.57 (m, 2H, H₁₁), 2.27 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H₁₀), 4.44 (s, 4H, H_{7,8}), 6.92 (s, 1H, H₄), 7.43 (s, 2H, H_{2,6}), 9.76 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d^6) δ ppm 14.1 (C₂₄), 22.2 (C₁₁), 28.8, 28.9, 29.1, 29.2, 31.4 (C₁₂₋₂₃), 33.5 (C₁₀), 63.1 (C_{7,8}), 115.7 (C_{2,6}), 119.2 (C₄), 139.2 (C_{3,5}), 142.9 (C₁), 171.3 (CO). IR (ν , cm⁻¹): 3330 (ν_{OH}), 2920 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1655 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1543 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1464 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1219 ($\nu_{\text{C-N}}$), 850 ($\nu_{\text{C-C}}$), 719. ESI-HRMS (m/z): found: 414.2987 (M+Na⁺) (calc for C₂₄H₄₁NNaO₃: 414.2979).

6. Synthesis of N-(3,5-bis(bromomethyl)phenyl)dodecanamide (5-l)



General procedure A: N-(3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl)dodecanamide **4-l** (580 mg, 1.72 mmol) was dissolved in 6 mL of 33% solution of HBr in glacial acetic acid and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. Then, the reaction mixture was poured into water (100 mL), the precipitate was collected, washed with petroleum ether and dried. Yield: 371 mg (76 %). Mp: 116 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H_{20}), 1.27 (m, 16H, H_{12-19}), 1.72 (m, 2H, H_{11}), 2.36 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_{10}), 4.43 (s, 4H, $\text{H}_{7,8}$), 7.16 (s, 1H, H_4), 7.27 (s, 1H, NH), 7.54 (s, 2H, $\text{H}_{2,6}$). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.1 (C_{20}), 22.7 (C_{11}), 29.2, 29.5, 29.6, 32.3 (C_{12-19}), 32.5 (C_{10}), 37.7 ($\text{C}_{7,8}$), 120.1 ($\text{C}_{2,6}$), 125.1 (C_4), 138.7 ($\text{C}_{3,5}$), 139.2 (C_1), 171.5 (CO). IR (ν , cm^{-1}): 2918 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1658 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1557 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1466 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1245 ($\nu_{\text{C-N}}$), 876 ($\nu_{\text{C-C}}$). ESI-HRMS (m/z): found: 484.0634 ($\text{M}+\text{Na}^+$) (calc for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{Br}_2\text{NNaO}$: 484.0645).

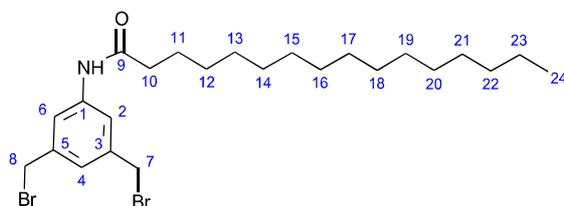
7. Synthesis of N-(3,5-bis(bromomethyl)phenyl)stearamide (5-s)



Following procedure A: Compound **5-s** was prepared from N-(3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl)stearamide **4-s** (589 mg, 1.40 mmol). Yield: 690 mg (90 %). Mp: 117 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6$ Hz, 3H, H_{26}), 1.26 (m, 28H, H_{12-25}), 1.73 (m, 2H, H_{11}), 2.36 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_{10}), 4.44 (s, 4H, $\text{H}_{7,8}$), 7.16 (s, 1H, H_4), 7.24 (s, 1H, NH), 7.54 (s, 2H, $\text{H}_{2,6}$). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.1 (C_{26}), 22.7 (C_{11}), 25.5, 29.2, 29.65, 29.69, 29.8, 31.6 (C_{12-25}), 32.5 (C_{10}), 37.8 ($\text{C}_{7,8}$), 120.1 ($\text{C}_{2,6}$), 125.1 (C_4), 138.7 ($\text{C}_{3,5}$), 139.2 (C_1), 171.5 (CO). IR (ν , cm^{-1}): 2918 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1660 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1546 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1463 ($\nu_{\text{C=C}}$).

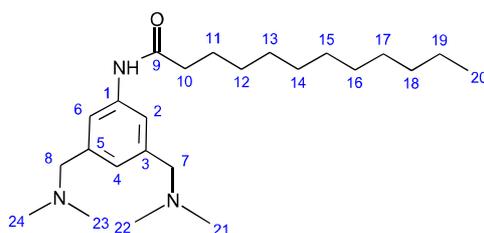
C=C), 1255 ($\nu_{\text{C-N}}$), 878 ($\nu_{\text{C-C}}$). ESI-HRMS (m/z): found: 568.1573 ($M+\text{Na}^+$) (calc for $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{Br}_2\text{NNaO}$: 568.1604).

8. Synthesis of N-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]hexadecanamide (5-p)



Following procedure A: Compound **5-p** was prepared from N-[3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl] hexadecanamide **4-p** (1.17 g, 3 mmol) and 10 mL of 33% solution of HBr in glacial acetic acid. Yield: 1.5 g (97%). Mp: 120 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6$ Hz, 3H, H_{24}), 1.27 (m, 24H, H_{12-23}), 1.73 (m, 2H, H_{11}), 2.36 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_{10}), 4.44 (s, 4H, $\text{H}_{7,8}$), 7.16 (s, 1H, H_4), 7.19 (s, 1H, NH), 7.54 (s, 2H, $\text{H}_{2,6}$). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.1 (C_{24}), 22.7 (C_{11}), 25.5, 29.4, 29.6 (C_{12-23}), 32.5 (C_{10}), 37.8 ($\text{C}_{7,8}$), 120.1 ($\text{C}_{2,6}$), 125.1 (C_4), 138.7 ($\text{C}_{3,5}$), 139.3 (C_1), 171.5 (CO). IR (ν , cm^{-1}): 2918 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1658 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1558 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1466 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1265 ($\nu_{\text{C-N}}$), 875 ($\nu_{\text{C-C}}$). ESI-HRMS (m/z): found: 540.1278 ($M+\text{Na}^+$) (calc for $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{Br}_2\text{NNaO}$: 540.1272).

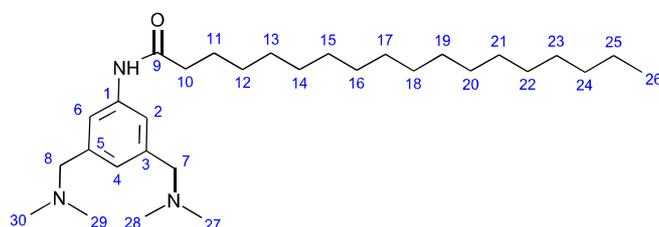
9. Synthesis of N-(3,5-bis((dimethylamino)methyl)phenyl)dodecanamide (6-1a)



Procedure B: A 40% aqueous solution of dimethylamine (5 mL) was added to a suspension of N-(3,5-bis(bromomethyl)phenyl)dodecanamide **5-l** (570 mg, 1.23 mmol) and potassium carbonate (803 mg, 5.82 mmol) in MeCN (20 mL). The resulting mixture was refluxed overnight, then cooled to room temperature and diluted with water (20 mL) and DCM (25 mL). The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with DCM (2 \times 25 mL). The organic phases were combined, dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (SiO_2 , DCM, then DCM/EtOH 97/3, then

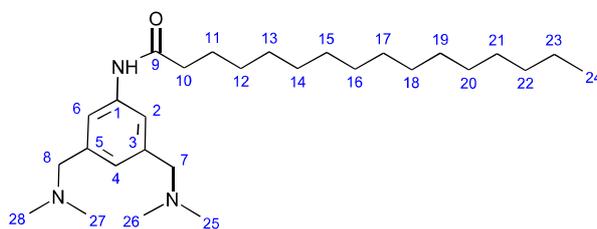
DCM/EtOH/NEt₃ 93/5/2). Yield: 560 mg (99 %). Mp: 57 °C. ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.73 (t, *J* = 7 Hz, 3H, H₂₀), 1.10 (m, 16H, H₁₂₋₁₉), 1.54 (q, *J* = 7 Hz, 2H, H₁₁), 2.05 (s, 12H, H_{21,22,23,24}), 2.18 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H₁₀), 3.20 (s, 4H, H_{7,8}), 6.85 (s, 1H, H₄), 7.27 (s, 2H, H_{2,6}), 7.99 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 13.9 (C₂₀), 22.4 (C₁₁), 25.5 (C₁₉), 29.1 (C_{21,22,23,24}), 29.4, 31.6, 37.4 (C₁₂₋₁₈), 45.1 (C₁₀), 63.8 (C_{7,8}), 119.2 (C_{2,6}), 125.1 (C₄), 137.9 (C_{3,5}), 139.3 (C₁), 171.6 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 2918 (ν C-H), 1660 (ν C=O), 1541 (ν N-H), 1470 (ν C=C), 1174 (ν C-N), 877 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 390.3482 (M+H⁺) (calc for C₂₄H₄₄N₃O: 390.3479).

10. Synthesis of N-(3,5-bis((dimethylamino)methyl)phenyl)stearamide (6-sa)



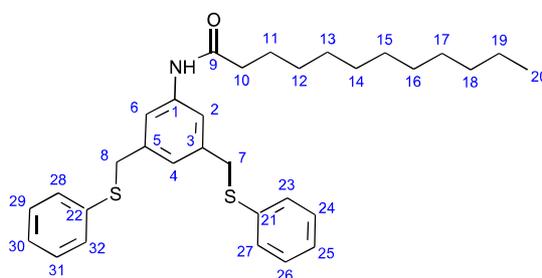
Following procedure B: Compound **6-sa** was prepared from a 40% aqueous solution of dimethylamine (3 mL), N-(3,5-bis(bromomethyl)phenyl)stearamide **5-s** (200 mg, 0.37 mmol) and potassium carbonate (306 mg, 2.22 mmol) in MeCN (15 mL). The residue was purified by flash chromatography (SiO₂, DCM, then DCM/EtOH 97/3, then DCM/EtOH/NEt₃ 93/5/2). Yield: 280 mg (99 %). Mp: 63 °C. ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.88 (t, *J* = 6 Hz, 3H, H₂₆), 1.25 (m, 28H, H₁₂₋₂₅), 1.70 (m, 2H, H₁₁), 2.26 (s, 12H, H_{27,28,29,30}), 2.33 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H₁₀), 3.42 (s, 4H, H_{7,8}), 7.02 (s, 1H, H₄), 7.35 (s, 1H, NH), 7.43 (s, 2H, H_{2,6}). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 14.2 (C₂₆), 22.7 (C₁₁), 25.6 (C₂₅), 29.3 (C_{27,28,29,30}), 29.4, 29.7, 31.9 (C₁₂₋₂₄), 45.3 (C₁₀), 64.0 (C_{7,8}), 119.3 (C_{2,6}), 125.6 (C₄), 138.1 (C_{3,5}), 139.4 (C₁), 171.4 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 2918 (ν C-H), 1660 (ν C=O), 1541 (ν N-H), 1470 (ν C=C), , 1175 (ν C-N), 874 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 474.4491 (M+H⁺) (calc for C₃₀H₅₆N₃O: 474.4421).

11. Synthesis of N-{3,5-bis[(dimethylamino)methyl]phenyl}hexadecanamide (6-pa)



Following procedure B: Compound **6-pa** was prepared from a 40% aqueous solution of dimethylamine (5 mL), N-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]hexadecanamide **5-p** (517 mg, 1 mmol) and potassium carbonate (828 mg, 6 mmol) in MeCN (20 mL). The residue was purified by flash chromatography (SiO₂, DCM, then DCM/EtOH 97/3, then DCM/EtOH/NEt₃ 93/5/2). Yield: 317 mg (71%). Mp: 60 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, *J* = 6 Hz, 3H, H₂₄), 1.26 (m, 24H, H₁₂₋₂₃), 1.71 (m, 2H, H₁₁), 2.25 (s, 12H, H_{25,26,27,28}), 2.32 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H₁₀), 3.41 (s, 4H, H_{7,8}), 7.02 (s, 1H, H₄), 7.23 (s, 1H, NH), 7.41 (s, 2H, H_{2,6}). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.1 (C₂₄), 22.7 (C₁₁), 25.6 (C₂₃), 29.37 (C_{25,26,27,28}), 29.45, 29.7, 31.9, 37.8 (C₁₂₋₂₂), 45.3 (C₁₀), 64.0 (C_{7,8}), 119.2 (C_{2,6}), 125.5 (C₄), 138.0 (C_{3,5}), 139.6 (C₁), 171.3 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 2918 (ν C-H), 1660 (ν C=O), 1541 (ν N-H), 1470 (ν C=C), 1173 (ν C-N), 877 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 446.4104 (M+H⁺) (calc. for C₂₈H₅₂N₃O: 446.4105).

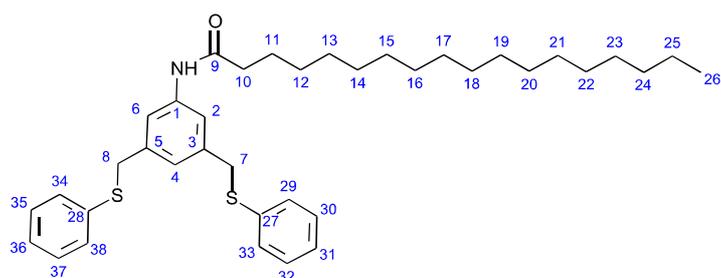
12. Synthesis of N-{3,5-bis[(phenylsulfanyl)methyl]phenyl}dodecanamide



Following procedure B: Compound **6-ld** was prepared from N-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]dodecanamide **5-l** (450 mg, 1.0 mmol), potassium carbonate (803 mg, 5.82 mmol) and thiophenol (431 mg, 3.8 mmol). The product was purified by flash

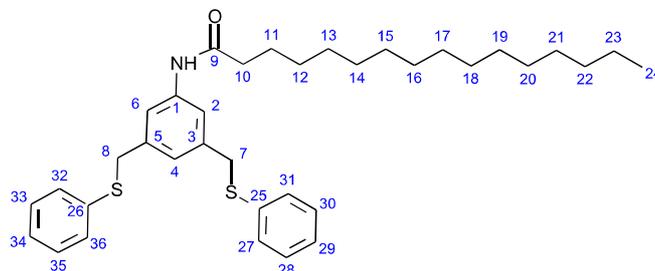
chromatography (SiO₂, PE/AcOEt 8/2, then 1/1). Yield: 437 mg (87 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.82 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H₂₀), 1.15 (m 24H, H₁₂₋₁₉), 1.60 (m, 2H, H₁₁), 2.19 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H₁₀), 3.50 (s, 4H, H_{7,8}), 7.15 (s, 1H, H₄), 7.19 (m, 2H, H_{25,30}), 7.28 (m, 4H, H_{24,26,29,31}), 7.30 (m, 4H, H_{23,27,28,32}), 7.35 (s, 2H, H_{2,6}). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.1 (C₂₀), 22.9 (C₁₁), 25.3, 29.2, 29.3, 29.7, 31.9 (C₁₂₋₁₉), 38.9 (C₁₀), 47.5 (C_{7,8}), 118.9 (C_{2,6}), 126.3 (C_{24,26,29,31}), 126.9 (C₄), 128.5 (C_{25,30}) 129.8 (C_{23,27,28,32}), 138.4 (C_{5,3}), 140.8 (C_{21,22}), 141.5 (C₁), 171.5 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 2918 (ν C-H), 1659 (ν C=O), 1560 (ν N-H), 1463 (ν C=C), 1248 (ν C-N), 869 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 520.5042 (M+H⁺) (calc. for C₃₂H₄₂NOS₂: 520.5049).

13. Synthesis of N-{3,5-bis[(phenylsulfanyl)methyl]phenyl}steramide



Following procedure B: Compound **6-sd** was prepared from N-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]hexadecanamide **5-s** (654 mg, 1.2 mmol), potassium carbonate (2.42 g, 17.5 mmol) and thiophenol (534 mg, 4.8 mmol). The product was purified by flash chromatography (SiO₂, PE/AcOEt 8/2, then 1/1). Yield: 549 mg (76%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.81 (t, *J* = 7 Hz, 3H, H₂₆), 1.16 (m 24H, H₁₂₋₂₅), 1.63 (m, 2H, H₁₁), 2.22 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H₁₀), 3.48 (s, 4H, H_{7,8}), 7.13 (s, 1H, H₄), 7.16 (m, 2H, H_{31,36}), 7.25 (m, 4H, H_{30,32,35,37}), 7.29 (m, 4H, H_{29,33,34,38}), 7.32 (s, 2H, H_{2,6}). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.4 (C₂₆), 22.3 (C₁₁), 25.6, 29.3, 29.4, 29.6, 29.7, 31.9 (C₁₂₋₂₅), 37.7 (C₁₀), 48.4 (C_{7,8}), 117.9 (C_{2,6}), 125.4 (C_{30,32,35,37}), 126.7 (C₄), 128.5 (C_{31,36}) 129.7 (C_{29,33,34,38}), 138.3 (C_{5,3}), 140.3 (C_{27,28}), 140.9 (C₁), 170.9 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 2918 (ν C-H), 1658 (ν C=O), 1558 (ν N-H), 1459 (ν C=C), 1256 (ν C-N), 867 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 603.5421 (M+H⁺) (calc. for C₃₈H₅₄NOS₂: 603.5457).

14. Synthesis of N-{3,5-bis[(phenylsulfanyl)methyl]phenyl}palmamide



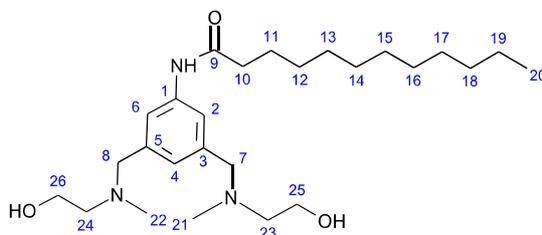
Following procedure B: Compound **6-pd** was prepared from N-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]hexadecanamide **5-p** (207 mg, 0.4 mmol), potassium carbonate (332 mg, 2.4 mmol) and thiophenol (178 mg, 1.6 mmol). The product was purified by flash chromatography (SiO₂, PE/AcOEt 8/2, then 1/1). Yield: 223 mg (97%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.80 (t, J = 6.8 Hz, 3H, H₂₄), 1.15 (m 24H, H₁₂₋₂₃), 1.65 (m, 2H, H₁₁), 2.24 (t, J = 7 Hz, 2H, H₁₀), 3.50 (s, 4H, H_{7,8}), 7.11 (s, 1H, H₄), 7.15 (m, 2H, H_{29,34}), 7.20 (m, 4H, H_{28,30,33,35}), 7.25 (m, 4H, H_{27,31,32,36}), 7.34 (s, 2H, H_{2,6}). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.0 (C₂₄), 22.9 (C₁₁), 25.6, 29.28, 29.33, 29.7, 31.9 (C₁₂₋₂₃), 37.9 (C₁₀), 45.5 (C_{7,8}), 118.3 (C_{2,6}), 122.0 (C_{28,30,33,35}), 125.6 (C₄), 129.0 (C_{29,34}) 130.8 (C_{27,31,32,36}), 137.4 (C_{5,3}), 139.5 (C_{25,26}), 140.7 (C₁), 171.3 (CO). IR (ν , cm⁻¹): 2919 (ν C-H), 1660 (ν C=O), 1559 (ν N-H), 1468 (ν C=C), 1252 (ν C-N), 874 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 576.9622 (M+H⁺) (calc. for C₃₆H₅₀NOS₃: 575.9624).

15. Synthesis

of

N-(3,5-

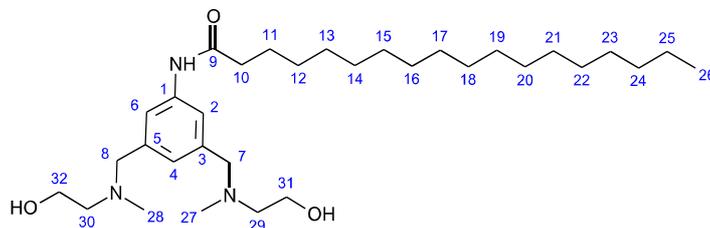
bis{[ethanol(methyl)amino]methyl}phenyl)dodecanamide (6-le)



Procedure C: N-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]dodecanamide **5-l** (200 mg, 0.43 mmol) was dissolved in acetonitrile (20 mL), then K₂CO₃ (237 mg, 1.72 mmol) and methylaminoethanol (0.4 mL, 0.86 mmol) were added. The mixture was stirred overnight at reflux. After

acetonitrile was evaporated under reduced pressure, DCM was added (30 mL), and the solution was washed with water, NaHCO₃ solution, dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure to afford **6-le** as a brown solid. Yield: 200 mg (99 %). Mp: 45 °C ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.82 (t, *J* = 6 Hz, 3 H, H₂₀), 1.19 (m, 18 H, H₁₂₋₁₉), 1.63 (m, 2 H, H₁₁), 2.16 (s, 6 H, H_{21,22}), 2.26 (t, *J* = 7 Hz, 2 H, H₁₀), 2.47 (t, *J* = 5 Hz, 4 H, H_{25,26}), 3.42 (s, 4 H, H_{23,24}), 3.54 (t, *J* = 5 Hz, 4 H, H_{7,8}), 6.91 (s, 1 H, H₄), 7.38 (s, 2 H, H_{2,6}), 8.35 (s, 1 H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.9 (C₂₀), 22.4 (C₁₁), 25.4 (C₁₉), 29.10 (C_{21,22}), 29.14, 29.2, 29.3, 29.38, 29.42, 31.6, 37.3, 41.7 (C₁₂₋₁₈), 53.3 (C₁₀), 58.2 (C_{25,26}), 58.4 (C_{23,24}), 62.0 (C_{7,8}), 119.1 (C_{2,6}), 124.8 (C₄), 138.3 (C_{3,5}), 139.1 (C₁), 171.9 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 3291 (ν O-H), 2918 (ν C-H), 1660 (ν C=O), 1544 (ν N-H), 1464 (ν C=C), 1123 (ν C-N), 877 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 450.3685 (M+H) (calc. for C₂₆H₄₈N₃O₃: 450.3690).

16. Synthesis of N-(3,5-bis[ethanol(methyl)amino]methyl)phenyl)stearamide (6-se)



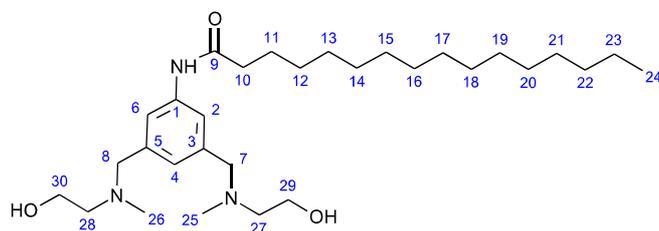
Following Procedure C: Compound **6-se** was prepared from N-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]stearamide **5-s** (200 mg, 0.37 mmol), K₂CO₃ (204 mg, 1.48 mmol) and methylaminoethanol (0.2 mL, 0.74 mmol) as a brown solid. Yield: 157 mg (78 %). Mp: 65 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.85 (m, 3 H, H₂₆), 1.23 (s, 33 H, H₁₂₋₂₅), 1.66 (s, 2 H, H₁₁), 2.19 (s, 6 H, H_{27,28}), 2.29 (t, *J* = 7 Hz, 2 H, H₁₀), 2.51 (m, 4 H, H_{31,32}), 3.46 (s, 4 H, H_{29,30}), 3.57 (s, 4 H, H_{7,8}), 6.95 (s, 1 H, H₄), 7.39 (s, 2 H, H_{2,6}), 8.06 (s, 1 H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.9 (C₂₆), 22.5 (C₁₁), 25.4 (C₂₅), 29.1 (C_{27,28}), 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.5, 31.7, 37.3 (C₁₂₋₂₄), 41.7 (C₁₀), 58.3 (C_{31,32}), 58.4 (C_{29,30}), 61.9 (C_{7,8}), 119.3 (C_{2,6}), 124.9 (C₄), 138.5 (C_{3,5}), 138.7 (C₁), 172.0 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 3292 (ν O-H), 2918 (ν C-H), 1659 (ν C=O), 1545 (ν N-H), 1465 (ν C=C), 1169 (ν C-N), 875 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 534.4650 (M+H) (calc. for C₃₂H₆₀N₃O₃: 534.4629).

17. Synthesis

of

N-(3,5-

bis{[ethanol(methyl)amino]methyl}phenyl)hexadecanamide (6-pe)



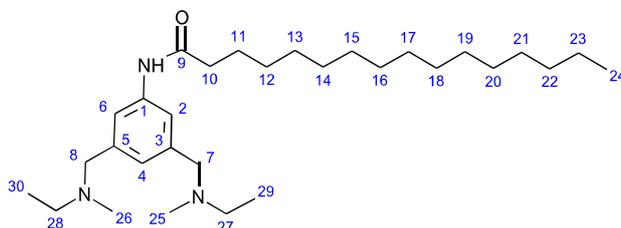
Following Procedure C: Compound **6-pe** was prepared from N-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]hexadecanamide **5-p** (200 mg, 0.38 mmol), K_2CO_3 (210 mg, 1.52 mmol) and methylaminoethanol (0.3 mL, 0.80 mmol) as a brown solid. Yield: 167 mg (87 %). Mp: 57 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.86 (t, $J = 6$ Hz, 3 H, H_{24}), 1.24 (s, 26H, H_{12-23}), 1.68 (m, 2 H, H_{11}), 2.24 (s, 6 H, $H_{25,26}$), 2.34 (m, 2 H, H_{10}), 2.56 (m, 4 H, $H_{29,30}$), 3.52 (s, 4 H, $H_{27,28}$), 3.61 (t, $J = 4.73$ Hz, 4 H, $H_{7,8}$), 6.99 (s, 1 H, H_4), 7.45 (s, 2 H, $H_{2,6}$), 8.00 (s, 1 H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 14.0 (C_{24}), 22.6 (C_{11}), 25.5 (C_{23}), 29.3 ($C_{25,26}$), 29.5, 29.6, 31.8, 37.5, 41.8 (C_{12-22}), 45.8 (C_{10}), 58.3 ($C_{29,30}$), 61.9 ($C_{27,28}$), 76.6 ($C_{7,8}$), 77.4 ($C_{2,6}$), 119.6 (C_4), 125.3 ($C_{3,5}$), 138.7 (C_1), 172.1 (CO). IR (ν , cm^{-1}): 3284 (ν_{O-H}), 2918 (ν_{C-H}), 1660 ($\nu_{C=O}$), 1611, 1547 (ν_{N-H}), 1464 ($\nu_{C=C}$), 1187 (ν_{C-N}), 875 (ν_{C-C}). ESI-HRMS (m/z): found: 506.4311(M+H) (calc. for $C_{30}H_{55}N_3O_3$: 506.4316).

18. Synthesis

of

N-(3,5-

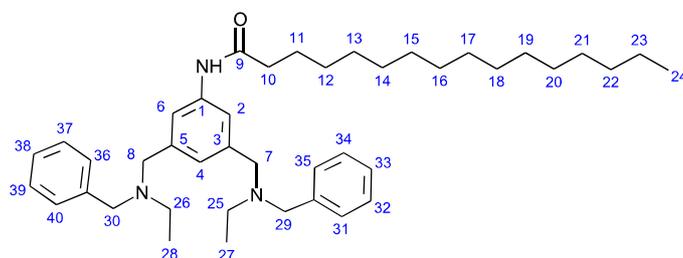
bis{[ethyl(methyl)amino]methyl}phenyl)hexadecanamide (6-pb)



Following procedure B: Compound **6-pb** was prepared from N-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]hexadecanamide **5-p** (400 mg, 0.77 mmol), potassium carbonate (638 mg, 4.62 mmol) and *N*-ethylmethylamine (137 mg, 0.2 mL, 2.32 mmol). The product was purified by flash chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH 95/5, then DCM/MeOH/ NEt_3

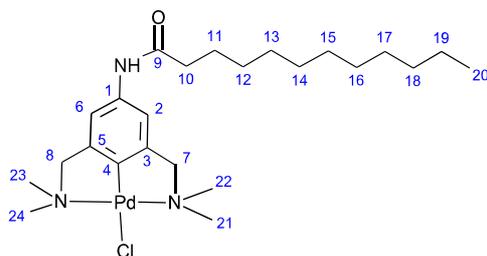
95/3/2). Yield: 201 mg (55%). Mp: 39 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, *J* = 6 Hz, 3H, H₂₄), 1.12 (t, *J* = 7 Hz, 6H, H_{29,30}), 1.26 (m, 24H, H₁₂₋₂₃), 1.71 (m, 2H, H₁₁), 2.22 (s, 6H, H_{25,26}), 2.33 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H₁₀), 2.49 (q, *J* = 7 Hz, 4H, H_{27,28}), 3.51 (s, 4H, H_{7,8}), 7.06 (s, 1H, H₄), 7.46 (s, 2H, H_{2,6}). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 12.1 (C₂₄), 14.1 (C_{29,30}), 22.7(C₁₁), 25.6 (C₂₃), 29.3 (C_{25,26}), 29.5, 29.6, 31.9, 37.8 (C₁₂₋₂₂), 41.4 (C₁₀), 51.2 (C_{27,28}), 61.5 (C_{7,8}), 119.3 (C_{2,6}), 125.7 (C₄), 138.1 (C_{3,5}), 139.3 (C₁), 171.4 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 2917 (ν C-H), 1660 (ν C=O), 1542 (ν N-H), 1470 (ν C=C), 1170 (ν C-N), 871 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 474.4406 (M+H⁺) (calc. for C₃₀H₅₆N₃O: 474.4418).

19. Synthesis of *N*-(3,5-bis{[benzyl(ethyl)amino]methyl}phenyl)hexadecanamide (6-pc)



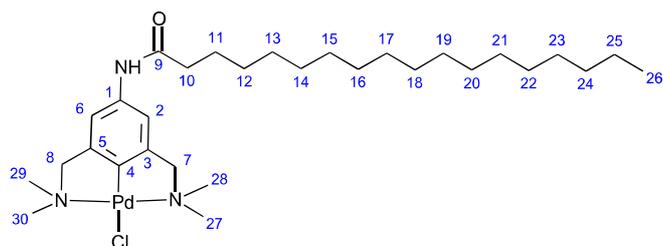
Following procedure B: Compound **6-pc** was prepared from *N*-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]hexadecanamide **5-p** (207 mg, 0.4 mmol), potassium carbonate (332 mg, 2.4 mmol) and *N*-ethylbenzylamine (113 mg, 125 μL, 0.84 mmol). The product was purified by flash chromatography (SiO₂, PE/AcOEt 8/2, then 1/1). Yield: 193 mg (77%). Mp: 36 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.78 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, H₂₄), 0.97 (t, *J* = 7 Hz, 6H, H_{27,28}), 1.17 (m 24H, H₁₂₋₂₃), 1.63 (m, 2H, H₁₁), 2.24 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H₁₀), 2.41 (q, *J* = 7 Hz, 4H, H_{25,26}), 3.45 (s, 4H, H_{29,30}), 3.48 (s, 4H, H_{7,8}), 7.10 (s, 1H, H₄), 7.14 (m, 2H, H_{33,38}), 7.19 (m, 4H, H_{32,34,37,39}), 7.28 (m, 4H, H_{31,35,36,40}), 7.33 (s, 2H, H₄). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 12.0 (C₂₄), 14.1 (C_{27,28}), 22.7 (C₁₁), 25.6, 29.28, 29.33, 29.7, 31.9 (C₁₂₋₂₃), 37.9 (C₁₀), 47.1 (C_{25,26}), 57.6 (C_{7,8}), 57.7 (C_{29,30}), 118.5 (C_{2,6}), 125.0 (C_{32,34,37,39}), 126.7 (C₄), 128.1 (C_{33,38}), 128.8 (C_{31,35,36,40}), 137.9 (C_{5,3}), 139.8 (C_{41,42}), 140.7 (C₁), 171.3 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 2918 (ν C-H), 1657 (ν C=O), 1558 (ν N-H), 1461 (ν C=C), 1251 (ν C-N), 867 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 626.5022 (M+H⁺) (calc. for C₄₂H₆₄N₃O: 626.5044).

20. Synthesis of 7-la



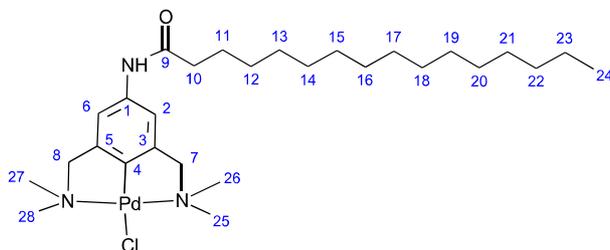
Procedure D: Mercury(II) acetate (67.0 mg, 0.21 mmol) was added to a solution of N-{3,5-bis[(dimethylamino)methyl]phenyl}dodecanamide **6-la** (100 mg, 0.21 mmol) in absolute ethanol (10 mL) and the resulting mixture was refluxed for 24 h. Then, excess LiCl was added to the reaction mixture and refluxed 15 min. Then, the solvent was evaporated and the residue partitioned in DCM/water (20 mL/10 mL). The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted with DCM (2 × 20 mL). Organic extracts were combined, dried over Na₂SO₄ and evaporated. The product was used in the next step without further purification. Yield: 70 mg (57 %). The mercurated derivative (70 mg, 0.11 mmol) was dissolved in DCM/MeOH (2:1, 15 mL) and Pd(OAc)₂ (18.4 mg, 0.11 mmol) was added to this solution. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. Then, the solution was filtered on Celite and the filtrate evaporated. The residue was redissolved in MeOH (10 mL) and treated with LiCl for 1 h. The solvent was removed under vacuum and the residue redissolved in DCM (15 mL) and this solution was filtered through Celite. The filtrate was evaporated and the residue was purified by flash chromatography (SiO₂, DCM/EtOH 24/1). Yield: 41 mg (77 %). ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.89 (t, *J* = 6 Hz, 3H, H₂₀), 1.28 (s, 16H, H₁₂₋₁₉), 1.66 (m, 2H, H₁₁), 2.35 (dt, *J* = 14.3, 7 Hz, 2H, H₁₀), 2.85 (s, 12H, H_{21,22,23,24}), 3.99 (s, 4H, H_{7,8}) 7.09 (s, 2H, H_{2,6}). ¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ ppm 14.7 (C₂₀), 23.9 (C₁₁), 27.2 (C₁₉), 29.8 (C_{21,22,23,24}), 30.3, 30.5, 30.6, 30.6, 30.8, 30.9, 33.2, 38.2 (C₁₂₋₁₈), 53.5 (C₁₀), 75.6 (C_{7,8}), 113.9 (C_{2,6}), 137.2 (C_{3,5}), 146.7 (C₁), 152.0 (C₄), 174.4 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 2918 (ν C-H), 1654 (ν C=O), 1599 (ν N-H), 1542 (ν C=C), 1258 (ν C-N), 868 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 494.0236 (M-Cl⁻) (calc for C₂₄H₄₃N₃OPd: 494.1247).

21. Synthesis of 7-sa



Following procedure D: Mercuration was performed with mercury(II) acetate (67.0 mg, 0.21 mmol) and N-{3,5-bis[(dimethylamino)methyl]phenyl} stearamide **6-sa** (100 mg, 0.21 mmol). Yield: 80 mg (57 %). Palladation was performed with the mercurated derivative (80 mg, 0.11 mmol) and Pd(OAc)₂ (18.2 mg, 0.11 mmol) to afford **7-sa**. Yield: 47 mg (75 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.89 (t, *J* = 6 Hz, 3H, H₂₆), 1.26 (s, 28H, H₁₂₋₂₅), 1.69 (m, 2H, H₁₁), 2.32 (m, 2H, H₁₀), 2.94 (s, 12H, H_{27,28,29,30}), 3.96 (s, 4H, H_{7,8}), 7.00 (s, 2H, H_{2,6}), 7.09 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.1 (C₂₆), 22.7 (C₁₁), 25.6 (C₂₅), 29.4 (C_{27,28,29,30}), 29.6, 29.7, 31.9, 37.8 (C₁₂₋₂₄), 53.2 (C₁₀), 74.5 (C_{7,8}), 112.4 (C_{2,6}), 127.5 (C_{3,5}), 135.1 (C₁), 145.2 (C₄), 176.8 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 2916 (ν C-H), 1658 (ν C=O), 1546 (ν N-H), 1462 (ν C=C), 1240 (ν C-N), 866 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 579.2736 (M-Cl⁻) (calc for C₃₀H₅₄N₃OPd: 579.1893).

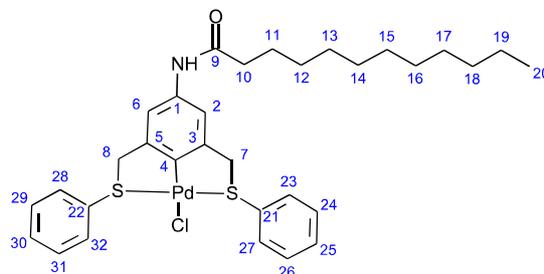
22. Synthesis of 7-pa



Following procedure D: Mercuration was performed with mercury(II) acetate (104 mg, 0.33 mmol) and N-{3,5-bis[(dimethylamino)methyl]phenyl}hexadecanamide **6-pa** (145 mg, 0.33 mmol) Yield: 150 mg (67%). Palladation was performed with mercurated derivative (150 mg, 0.22 mmol) and Pd(OAc)₂ (49 mg, 0.22 mmol) to afford **7-pa**. Yield: 96 mg (74%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, *J* = 6 Hz, 3H, H₂₄), 1.25 (s, 24H, H₁₂₋₂₃), 1.68 (m, 2H, H₁₁), 2.33 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H₁₀), 2.91 (s, 12H, H_{25,26,27,28}), 3.94 (s, 4H, H_{7,8}), 7.02 (s, 2H, H_{2,6}), 7.31 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.1 (C₂₄), 22.7 (C₁₁), 25.7 (C₂₃), 29.3 (C_{25,26,27,28}), 29.61, 29.64, 31.9, 37.7, 53.1 (C₁₂₋₂₂), 74.4 (C₁₀), 112.5 (C_{7,8}), 135.3 (C_{2,6}), 145.1 (C_{3,5}), 151.8 (C₄), 171.5 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 2980 (ν C-H), 1659 (ν C=O), 1597 (ν N-H), 1540 (ν

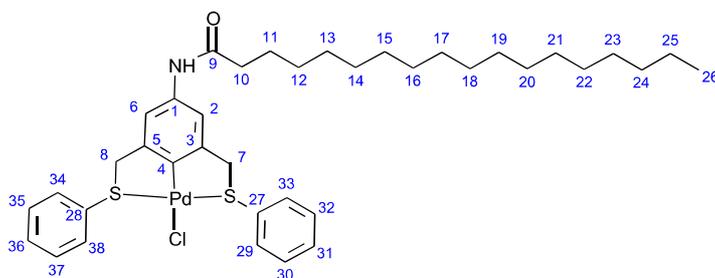
C=C), 1258 ($\nu_{\text{C-N}}$), 868 ($\nu_{\text{C-C}}$). ESI-HRMS (m/z): found: 550.3025 (M-Cl) (calc for $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{OPd}$: 550.2989).

23. Synthesis of 7-ld



Procedure F : The ligand **7-ld** (155 mg, 0.3 mmol) was dissolved in acetonitrile (10 mL) under argon in dry flask. Then $\text{Pd}(\text{PhCN})_2\text{Cl}_2$ (114 mg, 0.3 mmol) was added. The mixture was stirred 1 h at room temperature and then reflux overnight. Hot filtration on celite was made and washed with acetonitrile. Then the filtrate was evaporated at reduced pressure. The purification by recrystallisation in acetonitrile afforded the product as a yellow. Yield: 79 mg (40%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.81 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H_{20}), 1.17 (m 24H, H_{12-19}), 1.56 (m, 2H, H_{11}), 2.34 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_{10}), 4.47 (s, 4H, $\text{H}_{7,8}$), 7.20 (m, 2H, $\text{H}_{25,30}$), 7.35 (m, 4H, $\text{H}_{24,26,29,31}$), 7.40 (m, 4H, $\text{H}_{23,27,28,32}$), 7.75 (s, 2H, $\text{H}_{2,6}$). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 13.4 (C_{20}), 22.8 (C_{11}), 25.6, 29.28, 29.33, 29.7, 31.9 (C_{12-19}), 37.9 (C_{10}), 47.5 ($\text{C}_{7,8}$), 119.3 ($\text{C}_{2,6}$), 125.5 ($\text{C}_{24,26,29,31}$), 128.4 ($\text{C}_{25,30}$), 129.1 ($\text{C}_{23,27,28,32}$), 138.7 ($\text{C}_{5,3}$), 139.8 ($\text{C}_{21,22}$), 140.7 (C_1), 146.7 (C_4), 172.3 (CO). IR (ν , cm^{-1}): 2918 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1660 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1562 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1465 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1257 ($\nu_{\text{C-N}}$), 860 ($\nu_{\text{C-C}}$). ESI-HRMS (m/z): found: 625.4126 (M-Cl) (calc. for $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{NOS}_2\text{Pd}$: 625.4124).

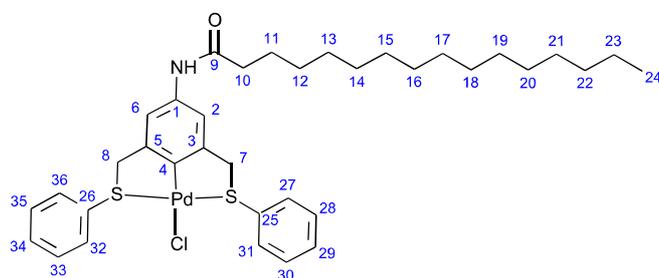
24. Synthesis of 7-sd



Following procedure F : Compound **7-sd** was prepared from **6-sd** (422 mg, 0.7 mmol) and $\text{Pd}(\text{PhCN})_2\text{Cl}_2$ (266 mg, 0.7 mmol). Yield: 343 mg (66%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm

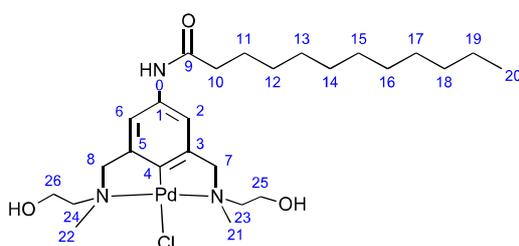
0.81 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H₂₆), 1.16 (m 24H, H₁₂₋₂₅), 1.65 (m, 2H, H₁₁), 2.30 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H₁₀), 4.44 (s, 4H, H_{7,8}), 7.21 (m, 2H, H_{31,36}), 7.30 (m, 4H, H_{30,32,35,37}), 7.35 (m, 4H, H_{29,33,34,38}), 7.70 (s, 2H, H_{2,6}). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.5 (C₂₆), 22.7 (C₁₁), 25.6, 29.3, 29.4, 29.6, 29.7, 31.9 (C₁₂₋₂₅), 37.9 (C₁₀), 50.5 (C_{7,8}), 119.3 (C_{2,6}), 125.6 (C_{30,32,35,37}), 128.7 (C_{31,36}) 129.4 (C_{29,33,34,38}), 138.9 (C_{5,3}), 140.7 (C_{27,28}), 142.2 (C₁), 146.2 (C₄), 172.6 (CO). IR (ν , cm⁻¹): 2918 (ν C-H), 1654 (ν C=O), 1559 (ν N-H), 1464 (ν C=C), 1255 (ν C-N), 871 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 709.5412 (M-Cl) (calc. for C₃₈H₅₂NOS₂Pd: 709.5415).

25. Synthesis of 7-pd



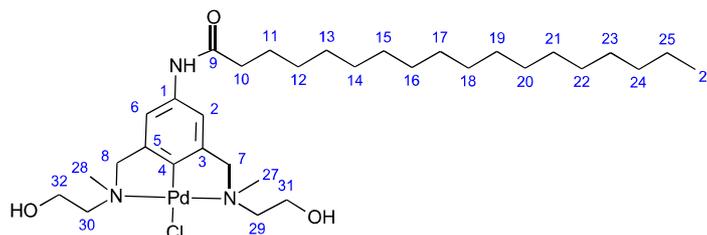
Following procedure F : Compound **7-pd** was prepared from **6-pd** (143 mg, 0.5 mmol) and Pd(PhCN)₂Cl₂ (190 mg, 0.5 mmol). Yield: 250 mg (70%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.78 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H₂₄), 1.17 (m 24H, H₁₂₋₂₃), 1.63 (m, 2H, H₁₁), 2.24 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H₁₀), 4.48 (s, 4H, H_{7,8}), 7.22 (m, 2H, H_{29,34}), 7.31 (m, 4H, H_{28,30,33,35}), 7.36 (m, 4H, H_{27,31,32,36}), 7.72 (s, 2H, H_{2,6}). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.1 (C₂₄), 22.9 (C₁₁), 25.6, 29.2, 29.3, 29.5, 29.6, 29.7, 31.9 (C₁₂₋₂₃), 38.9 (C₁₀), 53.5 (C_{7,8}), 118.5 (C_{2,6}), 126.0 (C_{28,30,33,35}), 128.1 (C_{29,34}) 129.8 (C_{27,31,32,36}), 139.9 (C_{5,3}), 140.8 (C_{25,26}), 143.7 (C₁), 148.7 (C₄), 172.3 (CO). IR (ν , cm⁻¹): 2919 (ν C-H), 1657 (ν C=O), 1559 (ν N-H), 1456 (ν C=C), 1247 (ν C-N), 870 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 681.2245 (M-Cl) (calc. for C₃₆H₄₈NOS₃Pd: 681.2244).

26. Synthesis of 7-le



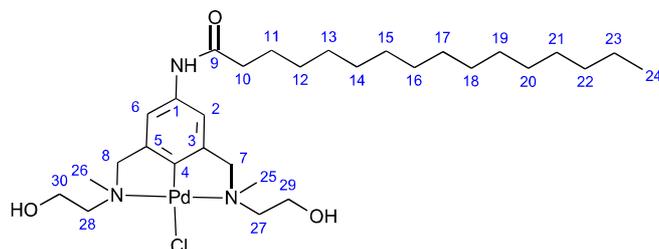
Following procedure D: Mercuration was performed with mercury(II) acetate (68.0 mg, 0.22 mmol) and N-(3,5-bis{[ethanol(methyl)amino]methyl}phenyl)lauramide **6-le** (100 mg, 0.22 mmol). Palladium was carried out from the mercurated compound (80 mg, 0.11 mmol) and Pd(OAc)₂ (18.2 mg, 0.11 mmol). Purification by recrystallization in diethylether. Yield: 20 mg (30 %). ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.89 (t, *J* = 7 Hz, 3 H, H₂₀), 1.28 (m, 24 H, H₁₂₋₁₉), 1.68 (m, 2 H, H₁₁), 2.41 (m, 2 H, H₁₀), 2.82 (m, 2H, H_{25,26}), 2.99 (s, 3H, H₂₁), 3.02 (s, 3H, H₂₂), 3.16 (m, 2H, H_{25,26}), 3.96 (dd, *J* = 15, 7 Hz, 2H, H_{7,8}), 4.24 (m, 2 H, H_{23,24}), 4.30 (m, 2H, H_{23,24}), 4.50 (d, *J* = 15 Hz, 2 H, H_{7,8}), 7.13 (s, 2 H, 2, 6). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 13.5 (C₂₀), 17.3 (C₁₁), 22.4 (C₁₉), 23.2 (C_{21,22}), 25.9, 28.95, 29.03, 29.1, 29.3, 31.6, 36.9, 47.4, 47.6, 52.0, 52.1 (C₁₂₋₁₈), 57.2 (C₁₀), 60.7 (C_{25,26}), 64.4 (C_{23,24}), 72.1 (C_{7,8}), 145.6 (C_{2,6}), 145.8 (C_{3,5}), 152.2 (C₁), 173.8 (C₄), 180.0 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 3295 (ν O-H), 2920 (ν C-H), 1655 (ν C=O), 1598 (ν N-H), 1451 (ν C=C), 1123 (ν C-N), 840 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 554. 2283 (M-Cl⁻) (calc for C₂₆H₄₅N₃O₃Pd: 554.0917).

27. Synthesis of 7-se



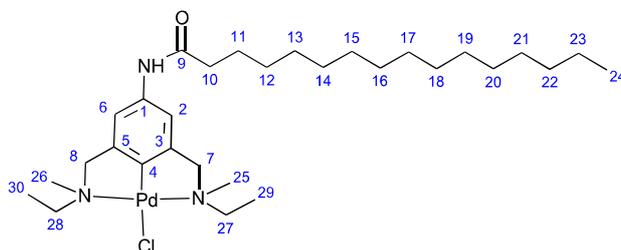
Following procedure D: Mercuration was performed with mercury(II) acetate (120 mg, 0.37 mmol) and N-(3,5-bis{[ethanol(methyl)amino]methyl}phenyl)stearamide **6-se** (200 mg, 0.37 mmol). Palladium was carried out from the mercurated compound (121 mg, 0.18 mmol) and Pd(OAc)₂ (34 mg, 0.18 mmol) as above to afford **7-se**. To Yield: 50 mg (20 %). ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ ppm 0.88 (t, *J* = 7 Hz, 3 H, H₂₆), 1.26 (s, 28 H, H₁₂₋₂₅), 1.67 (m, 2 H, H₁₁), 2.38 (s, 2 H, H₁₀), 2.81 (m, 2 H, H_{31,32}), 2.97 (s, 3 H, H₂₇), 3.00 (s, 3 H, H₂₈), 3.12 (m, 2 H, H_{31,32}), 3.96 (dd, *J* = 15, 7.89 Hz, 2 H, H_{7,8}), 4.21 (m, 2 H, H_{29,30}), 4.31 (m, 2 H, H_{29,30}), 4.49 (d, *J* = 15 Hz, 2 H, H_{7,8}), 7.07 (d, *J* = 2 Hz, 2 H, 2, 6). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 19.3 (C₂₆), 22.1 (C₁₁), 23.2 (C₂₅), 27.0 (C_{27,28}), 27.1, 27.2, 27.3, 27.5, 27.6, 30.3, 36.2 (C₁₂₋₂₄), 54.2 (C₁₀), 60.7 (C_{31,32}), 64.4 (C_{29,30}), 80.3 (C_{7,8}), 125.5 (C_{2,6}), 153.1 (C_{3,5}), 164.2 (C₁), 170.5 (C₄), 197.0 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 3300 (ν O-H), 2918 (ν C-H), 1644 (ν C=O), 1544 (ν N-H), 1450 (ν C=C), 1123 (ν C-N), 877 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 638.3544 (M-Cl⁻) (calc for C₃₂H₅₈N₃O₃Pd: 638.3520).

28. Synthesis of 7-pe



Following procedure D: Mercuration was performed with mercury(II) acetate (124 mg, 0.39 mmol) and *N*-(3,5-bis{[ethanol(methyl)amino]methyl}phenyl)hexadecamide **6-pe** (200 mg, 0.39 mmol). Palladium was carried out from the mercurated compound (129 mg, 0.20 mmol) and Pd(OAc)₂ (36.4 mg, 0.20 mmol) as above to afford **7-pe**. Yield: 50 mg (38 %). ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 0.87 (t, *J* = 6 Hz, 3 H, H₂₄), 1.25 (m, 24 H, H₁₂₋₂₃), 1.58 (m, 2 H, H₁₁), 2.38 (t, *J* = 7 Hz, 2 H, H₁₀), 2.83 (td, *J* = 11, 5 Hz, 2 H, H_{29,30}), 3.01 (s, 3H, H₂₅), 2.98 (s, 3H, H₂₆), 3.15 (m, 2 H, H_{29,30}), 3.97 (dd, *J* = 15, 10 Hz, 2 H, H_{7,8}), 4.26 (m, 2 H_{27,28}), 4.34 (m, 2 H, H_{27,28}), 4.49 (d, *J* = 15 Hz, 2 H, H_{7,8}), 7.13 (d, *J* = 4 Hz, 2 H, H_{2,6}). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 14.6 (C₂₄), 23.7 (C₁₁), 27.1 (C₂₃), 30.4 (C_{25,26}), 30.5, 30.6, 30.7, 33.1, 38.2, 53.2, 62.2 (C₁₂₋₂₂), 62.3 (C₁₀), 66.1 (C_{29,30}), 73.4 (C_{27,28}), 73.5 (C_{7,8}), 137.0 (C_{2,6}), 138.1 (C_{3,5}), 147.3 (C₁), 151.3 (C₄), 174.9 (CO). IR (ν, cm⁻¹): 3350 (ν_{O-H}), 2918 (ν_{C-H}), 1670 (ν_{C=O}), 1544 (ν_{N-H}), 1464 (ν_{C=C}), 1123 (ν_{C-N}), 880 (ν_{C-C}). ESI-HRMS (*m/z*): found: 610.2838 (M-Cl⁻) (calc for C₃₀H₅₃N₃O₃Pd: 610.1880).

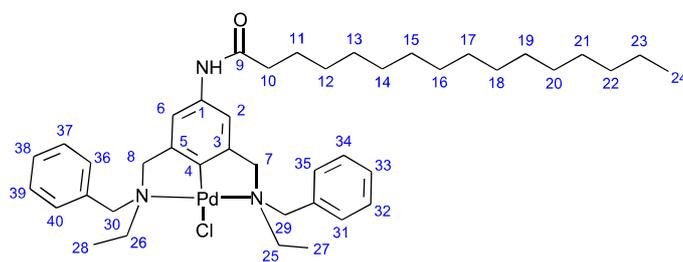
29. Synthesis of 7-pb



Following procedure D : Mercuration was performed from mercury(II) acetate (202 mg, 0.63 mmol) and *N*-(3,5-bis{[ethyl(methyl)amino]methyl}phenyl)hexadecanamide **6-pb** (300 mg, 0.63 mmol). Yield: 450 mg (quantitative). Palladium was carried out from the mercurated compound (450 mg, 0.63 mmol) and Pd(OAc)₂ (142 mg, 0.63 mmol) as above to afford **7-pb**. Product was subjected to flash chromatography (SiO₂, DCM/EtOH 24/1). Yield: 330 mg

(85%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.87 (t, $J = 6$ Hz, 3H, H_{24} , 1st and 2nd diastereomers), 1.25 (s, 24H, H_{12-23} , 1st and 2nd diastereomers), 1.56 (t, $J = 7$ Hz, 2H, $\text{H}_{29,30}$, 1st diastereomer), 1.55 (t, $J = 7$ Hz, 3H, $\text{H}_{29,30}$, 2nd diastereomer), 1.67 (m, 2H, H_{11} , 1st and 2nd diastereomers), 2.31 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_{10} , 1st and 2nd diastereomers), 2.53 (m, 1H, 2 $\text{H}_{27,28}$, 1st diastereomer), 2.60 (m, 2H, $\text{H}_{27,28}$, 2nd diastereomer), 2.96 (s, 3H, $\text{H}_{25,26}$, 2nd diastereomer), 3.00 (s, 3H, $\text{H}_{25,26}$, 1st diastereomer), 3.11 (dq, $J = 14, 7$ Hz, 2H, $\text{H}_{27,28}$, 2nd diastereomer), 3.22 (dq, $J = 14, 7$ Hz, 2H, $\text{H}_{27,28}$, 1st diastereomer), 3.69 (d, $J = 15$ Hz, 1H, $\text{H}_{7,8}$, 1st diastereomer), 3.73 (d, $J = 15$ Hz, 1H, $\text{H}_{7,8}$, 2nd diastereomer), 4.13 (d, $J = 15$ Hz, 1H, $\text{H}_{7,8}$, 2nd diastereomer), 4.18 (d, $J = 15$ Hz, 1H, $\text{H}_{7,8}$, 1st diastereomer), 6.99 (s, 1H, NH, 1st diastereomer), 7.00 (s, 1H, NH, 2nd diastereomer), 7.37 (s, 2H, $\text{H}_{2,6}$, 1st diastereomer), 7.39 (s, 2H, $\text{H}_{2,6}$, 2nd diastereomer). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 13.6 (C_{24} , 1st and 2nd diastereomer), 13.8 (C_{29} , 1st diastereomer), 14.2 (C_{29} , 2nd diastereomers), 22.8, 25.8, 29.39, 29.45, 29.52, 29.60, 29.75, 29.77, 32.01 (C_{12-23} , 1st and 2nd diastereomers), 37.8 (C_{10} , 1st and 2nd diastereomers), 52.1 ($\text{C}_{25,26}$, 2nd diastereomer), 52.2 ($\text{C}_{25,26}$, 1st diastereomer), 58.2 ($\text{C}_{27,28}$, 1st diastereomer), 58.4 ($\text{C}_{27,28}$, 2nd diastereomer), 70.4 ($\text{C}_{7,8}$, 1st diastereomer), 70.8 ($\text{C}_{7,8}$, 2nd diastereomer), 112.0 ($\text{C}_{2,6}$, 1st diastereomer), 112.2 ($\text{C}_{2,6}$, 2nd diastereomer), 135.2 ($\text{C}_{3,5}$, 2nd diastereomer), 135.4 ($\text{C}_{3,5}$, 1st diastereomer), 146.0 (C_1 , 2nd diastereomer), 146.2 (C_1 , 1st diastereomer), 150.2 (C_4 , 1st diastereomer), 150.4 (C_4 , 2nd diastereomer), 171.6 (CO, 1st and 2nd diastereomers). IR (ν , cm^{-1}): 2924 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1659 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1540 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1452 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1258 ($\nu_{\text{C-N}}$), 869 ($\nu_{\text{C-C}}$). ESI-HRMS (m/z): found: 730.3936 (M-Cl⁻) (calc for $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{N}_3\text{OPd}$: 730.3928).

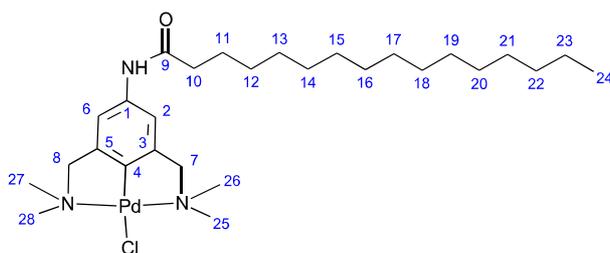
30. Synthesis of 7-pc



Following procedure D : Mercuration was performed with mercury(II) acetate (198 mg, 0.62 mmol) and *N*-(3,5-bis{[benzyl(ethyl)amino]methyl}phenyl)hexadecanamide **6-pc** (398 mg, 0.62 mmol). Yield: 331 mg (62%). Palladation was carried out from the mercurated derivative (331 mg, 0.38 mmol) and $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (86 mg, 0.38 mmol) as above to afford **7-pc**. Yield: 259 mg (89%). ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6$ Hz, 3H, H_{24} , 1st and 2nd

diastereomers), 1.26 (s, 24H, H₁₂₋₂₃, 1st and 2nd diastereomers), 1.61 (t, $J = 6$ Hz, 3H, H_{27,28}, 1st diastereomer), 1.65 (m, 2H, H₁₁, 1st and 2nd diastereomers), 1.69 (t, $J = 6$ Hz, H_{27,28} 3H, 2nd diastereomer), 2.25 (m, 2H, H₁₀, 1st and 2nd diastereomers), 2.40 (m, 2H, H₁₀, 1st and 2nd diastereomers), 2.67 (m, 2H, H_{25,26}, 2nd diastereomer), 2.72 (m, 1H, H_{25,26}, 1st diastereomer), 3.41 (m, 2H, H_{25,26}, 2nd diastereomer), 3.47 (m, 2H, H_{25,26}, 1st diastereomer), 3.63 (d, $J = 15$ Hz, 1H, H_{29,30}, 1st diastereomer), 3.75 (d, $J = 15$ Hz, 2H, H_{29,30}, 2nd diastereomer), 3.93 (d, $J = 12$ Hz, 2H, H_{29,30}, 1st diastereomer), 4.12 (d, $J = 13$ Hz, 2H, H_{29,30}, 2nd diastereomer), 4.16 (d, $J = 16$ Hz, 2H, H_{7,8}, 2nd diastereomer), 4.26 (d, $J = 15$ Hz, 2H, H_{7,8}, 1st diastereomer), 4.70 (d, $J = 13$ Hz, 2H, H_{7,8}, 2nd diastereomer), 4.78 (d, $J = 12$ Hz, 2H, H_{7,8}, 1st diastereomer), 6.80 (s, 2H, H_{2,6}, 1st diastereomer), 6.81 (s, 2H, H_{2,6}, 2nd diastereomer), 7.33 (m, 10H, H_{31,32,33,34,35,36,37,38,29,40}, 1st and 2nd diastereomers), 7.86 (d, $J = 6$ Hz, 1H, NH 1st or 2nd diastereomers). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.21 (C₂₄, 1st and 2nd diastereomers), 14.55 (C_{27,28}, 1st diastereomer), 14.57 (C_{27,28}, 2nd diastereomer), 22.78 (C₁₁, 1st and 2nd diastereomers), 25.82 (C₂₃, 1st and 2nd diastereomers), 29.37, 29.38, 29.41, 29.45, 29.47, 29.51, 29.59, 29.66, 29.72, 29.75, 29.76, 29.78, 29.82, 32.02 (C₁₂₋₂₂, 1st and 2nd diastereomers), 37.81 (C₁₀, 1st and 2nd diastereomers), 56.53 (C_{25,26}, 2nd diastereomer), 57.50 (C_{25,26}, 1st diastereomer), 64.87 (C_{7,8}, 1st and 2nd diastereomers), 65.43 (C_{29,30}, 1st diastereomer), 65.63 (C_{29,30}, 2nd diastereomer), 111.05, 111.21 (C_{2,6}, 1st and 2nd diastereomers), 128.35 (C_{32,34,37,39}, 1st and 2nd diastereomers), 128.62, 128.68 (C_{32,38}, 1st and 2nd diastereomers), 132.25, 132.32 (C_{31,35,36,40}, 1st and 2nd diastereomers), 133.66, 134.05 (C_{3,5}, 1st and 2nd diastereomers), 134.87 (C_{41,42}, 1st and 2nd diastereomers), 146.1, 146.4 (C₁, 1st and 2nd diastereomers), 150.0, 150.4 (C₄, 1st and 2nd diastereomers), 171.3 (CO, 1st and 2nd diastereomers). IR (ν , cm⁻¹): 2924 (ν C-H), 1658 (ν C=O), 1597 (ν N-H), 1495 (ν C=C), 1201 (ν C-N), 799 (ν C-C). ESI-HRMS (m/z): found: 578.3305 (M-Cl) (calc for C₃₀H₅₄N₃OPd: 578.3308).

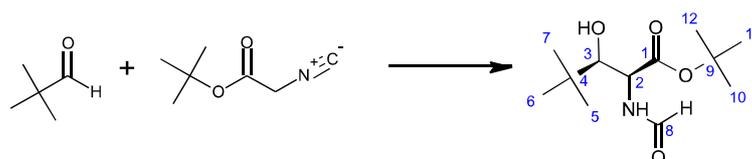
31. Synthesis of aqua complexes



Method E : For example from **7-pa⁺**: AgBF₄ (66 mg, 0.34 mmol) was added to the solution of **7-pa** (200 mg, 0.34 mmol) in dichloromethane (10 mL). The resulted mixture was stirred for 1 h at room temperature. The reaction was filtered through celite and filtrate was evaporated to afford the aqua complex as a yellow solid. Yield: 191 mg (86 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, *J* = 6 Hz, 3 H, H₂₄), 1.25 (s, 24 H), 1.72 (s, 2 H, H₁₁), 2.40 (s, 2 H, H₁₀), 2.78 (s, 12 H, H_{25,26,27,28}), 3.89 (s, 4 H, H_{7,8}), 7.03 (s, 2 H, H_{2,6}), 8.11 (s, 1 H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.1 (C₂₄), 22.7 (C₁₁), 25.9 (C₂₃), 29.3 (C_{25,26,27,28}), 29.5, 29.6, 29.6, 29.7, 31.9, 37.5, 52.1 (C₁₂₋₂₂), 73.5 (C₁₀), 113.5 (C_{7,8}), 135.6 (C_{2,6}), 145.1 (C_{3,5}), 151.5 (C₄), 176.1 (CO).

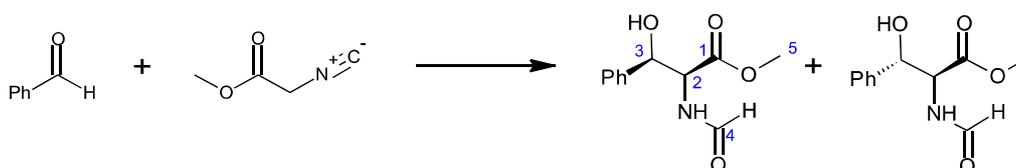
XIII. Synthesis of authentic aldol condensation products

1. *Tert*-butyl -2-(acetylamino)-3-hydroxy-4,4-dimethylpentanoate



Palladium acetate (10 mg, 10 mol%) was solubilized in 20 mM phosphate buffer pH = 7.5 (10 mL). Pivalaldehyde (50 mg, 0.50 mmol) and tert-butyliisocyanacetate (44 mg, 0.44 mmol) were added and the mixture was stirred for 72 h at room temperature. The aqueous solution was extracted with diisopropylether (2 x 9 mL). The organic phase was evaporated to dryness, the product was purified by flash chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 9/1). Yield: 68 mg (60%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃Cl) δ ppm 0.99 (s, 9 H, H_{5,6,7}), 1.49 (s, 9 H, H_{10,11,12}), 3.74 (d, *J* = 4 Hz, 1 H, H₃), 4.76 (d, *J* = 9 Hz, 1 H, H₂), 6.40 (m, 1 H, NH), 8.24 (s, 1 H, H₈). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃Cl) δ ppm 25.9 (C_{5,6,7}), 28.0 (C_{10,11,12}), 29.7 (C₃), 35.0 (C₂), 79.6 (C₄), 82.4 (C₉), 168.9 (CO₁), 172.7 (CO₈).

2. Methyl-2-(acetylamino)-3-hydroxy-3-phenylpropanoate

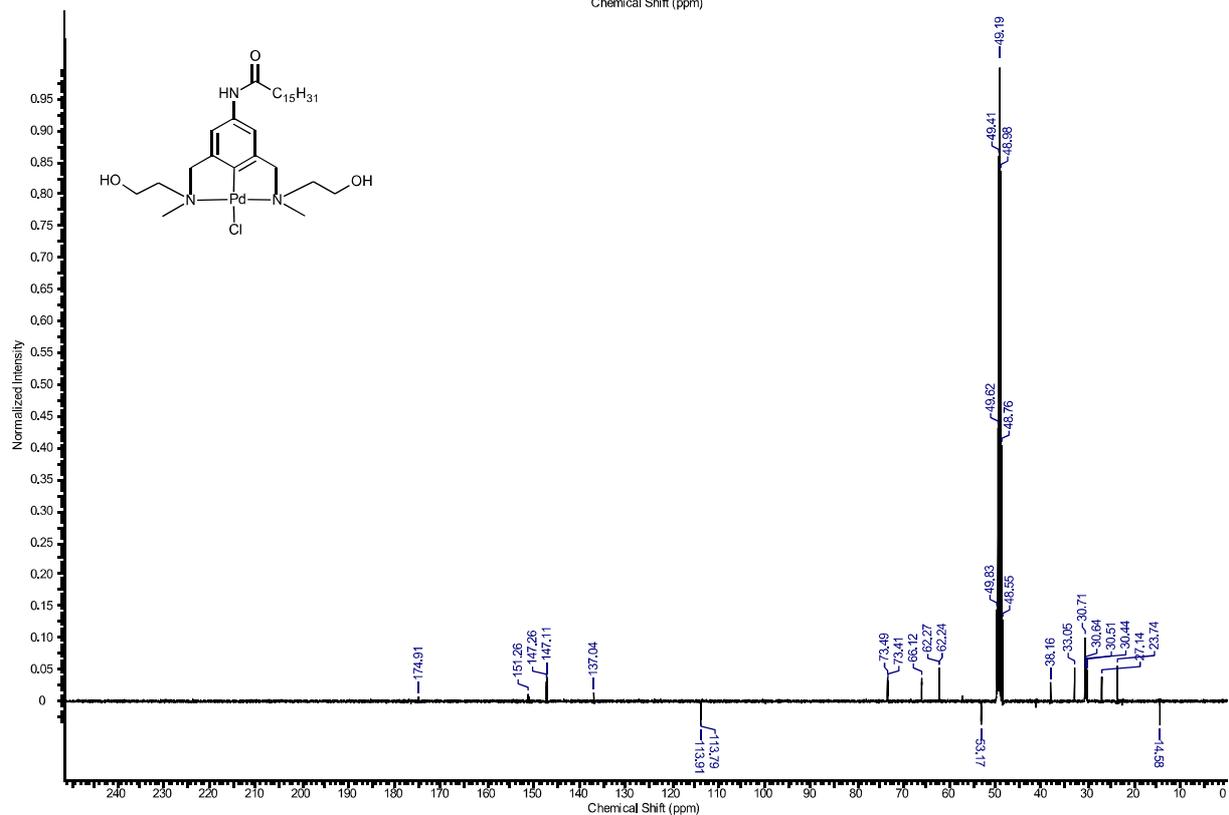
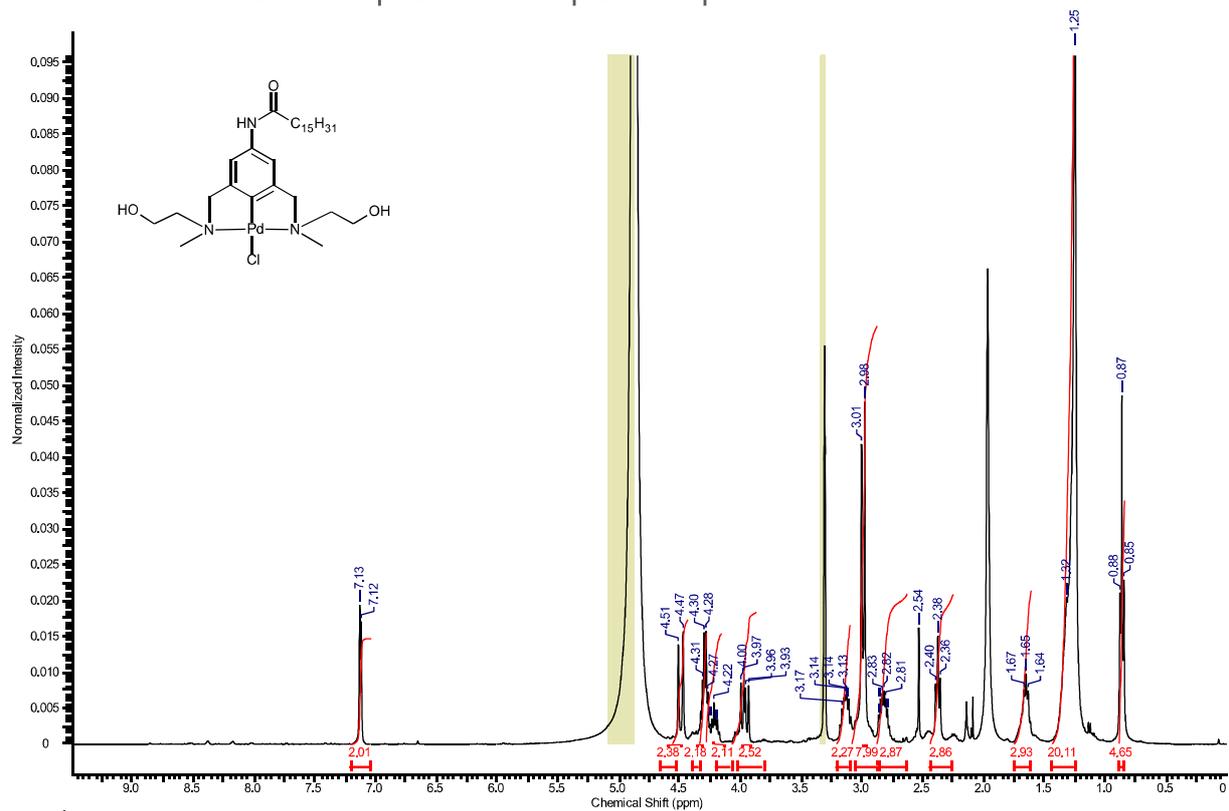


Palladium acetate (11 mg, 10% mol) was solubilized in 20 mM phosphate buffer pH = 7.5 (10 mL). Benzaldehyde (64 mg, 0.6 mmol) and methylisocyanoacetate (50 mg, 0.5 mmol) were added and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. The aqueous solution was extracted with diisopropylether (2 x 10 mL). The organic phase was evaporated to dryness, the product was purified by flash chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 9/1), to give a mixture of *Cis* and *Trans* diastereomers with *Trans* / *Cis* ratio of 82 / 18. Yield: 58 mg (52%).

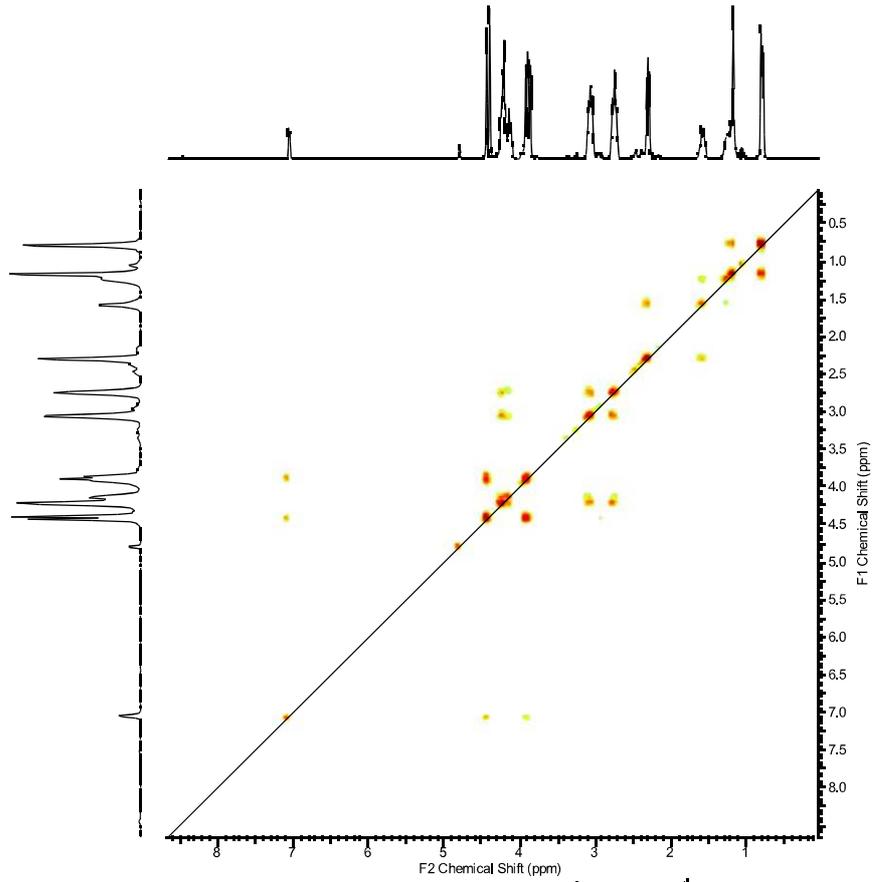
Trans: ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 3.31 (s, 3 H, H₅), 4.35 (d, *J* = 3 Hz, 1 H, H₃), 4.84 (d, *J* = 3 Hz, 1 H, H₂), 6.80 (m, 5 H, H_{ph}), 7.55 (s, 1 H, H₉). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 53.1 (C₅), 58.8 (C₃), 73.9 (C₂), 127.3, 129.3, 129.5, 142.4 (C_{ph}), 164.0 (CO₁), 172.0 (CO₄).

Cis: ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ ppm 3.24 (s, 3 H, H₅), 4.52 (d, *J* = 3 Hz, 1 H, H₃), 4.63 (d, *J* = 3 Hz, 1 H, H₂), 6.76 (m, 5 H, H_{ph}), 7.60 (s, 1 H, H₉). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ ppm 51.9 (C₅), 57.7 (C₃), 72.8 (C₂), 126.5, 127.9, 128.2, 141.3 (C_{ph}), 162.9 (CO₁), 170.9 (CO₄).

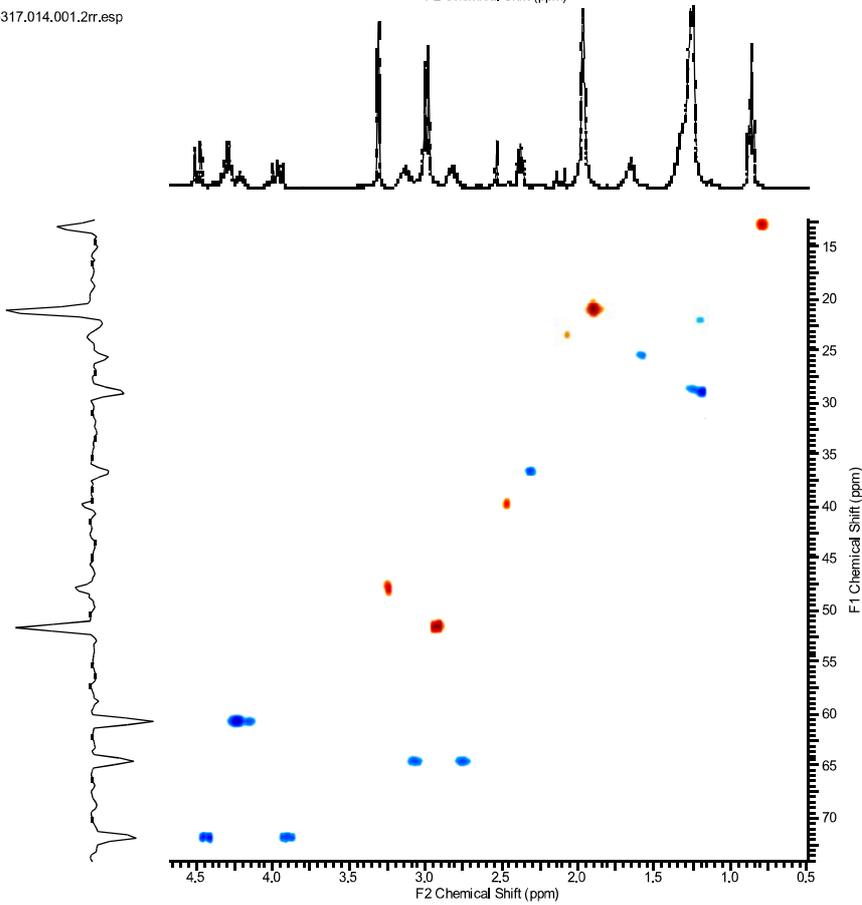
XIV. ^1H and ^{13}C NMR spectra of complexes 7-pe



lp317.012.001.2rr.esp



lp317.014.001.2rr.esp



XV. Computational details

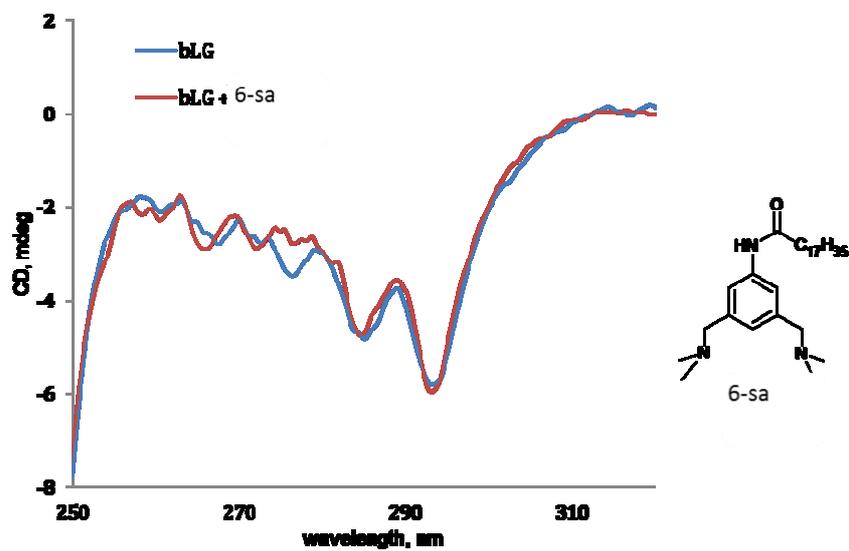
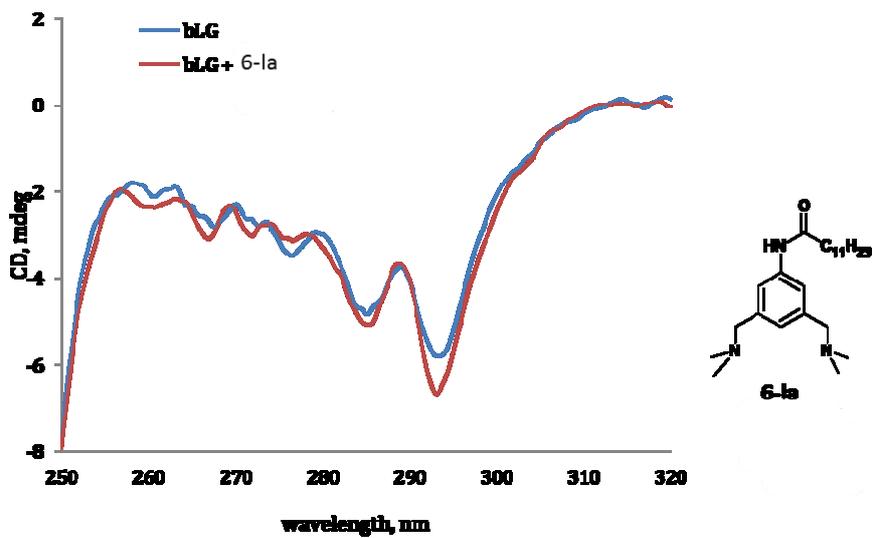
In order to evaluate the metal complex posing in the protein-binding site, docking simulations were carried out on compounds **7-pa**, **7-pc** and **7-pb**. All the possible stereoisomers of **7-pc** and **7-pb** were taken into account, namely **7-pc'** (**R,R**), **7-pc** (**R,S**), **7-pc** (**S,S**), **7-pb** (**R,R**), **7-pb** (**R,S**) and **7-pb** (**S,S**) so that a total number of 7 different ligands was considered for docking simulations. As a first step, these compounds were optimized at the Density Functional Theory level using the hybrid B3LYP functional. All atoms were described using a double zeta valence basis set including diffuse and polarization functions (i.e. the Pople 6-31+G(d,p) basis) except palladium, described by an effective core potential and corresponding valence basis set. Such a step allowed us to obtain accurate bond lengths involving the metal ion, held fixed during the successive docking simulations performed on the crystal structure of bovine β -LG with capric acid (PDB code: 3NQ3 – resolution 1.9 Å). Note that the crystal structure of bovine β -LG with a metal complex similar to the herein investigated compounds (Cp*Rh(III)Cl N,N-di(pyridin-2-yl)dodecanamide – PDB code 4KII) is also available in the Protein Data Bank. However, 5 residues (Ser110 – Ala111 – Glu112 – Pro113 – Glu114) close to the β -LG binding site are not solved, making this crystal an inappropriate candidate for docking simulations. Moreover, no substantial conformational difference can be detected after structural alignment of 4KII and 3NQ3 (the interested reader is referred to the supporting information for details) so that the latter was selected. The pdb file, retrieved from Protein Data Bank, was first pretreated using the protein preparation module available from the Schrodinger suite 2015-3, which enables to add missing hydrogen atoms and to determine the optimal protonation states for histidine residues. The obtained structure was used for docking simulations performed by GLIDE v6.8, which is part of the Schrodinger Suite. During the docking process, the receptor protein was held fixed, while full conformational flexibility was allowed for the ligands. The default Force Field OPLS_2005 and a cubic grid centered on the center of mass of the cognate ligand having an edge of 20 Å for the inner box and of 40 Å for the outerbox were used. All simulations were performed following the extreme precision (XP) protocol. Notably, in order to ensure an adequate exploration of the conformational space during docking simulations, 20000 poses per ligand were generated in the initial phase and, among them, 10000 were selected for post-docking minimization.

XVI. Circular dichroism spectroscopy.

Circular dichroism spectroscopy was carried out at 20 ± 0.1 °C on a J-815 CD spectrometer (Jasco). Near-uv CD spectra were recorded in a 1-cm pathlength quartz cell. The number of scans was set to 3 with a bandwidth of 1.0 nm and data pitch of 0.1 nm at scan speed of 50 nm/min. Far-uv CD spectra were recorded in a 2-mm pathlength quartz cell. The number of scans was set to 2 with a bandwidth of 1.0 nm and data pitch of 0.1 nm at scan speed of 20 nm/min. The resulting spectra were smoothed and baseline-corrected using the software provided with the CD spectrometer.

For the near-uv CD, stock solutions of β -LG (50 μ M in 20 mM phosphate pH 7.5), ligands and complexes (10 mM in DMSO or MeCN) were first prepared. The solution of β -LG was transferred to the cuvette and the near-UV CD spectrum of β -LG recorded. Then an aliquot of each ligand/complex was added to the solution of β -LG to achieve an equimolar amount of protein and ligand/complex and the CD spectrum was recorded immediately. For the displacement studies, the β -LG solution was first treated with 1 eq. of **Ref** and the CD spectrum recorded. To this reaction mixture was then added an equimolar amount of each ligand/complex and the CD spectrum recorded immediately. For the far-uv CD, stock solutions of β -LG (10 μ M in 20 mM phosphate pH 7.5), complexes (10 mM in DMSO or MeCN) were first prepared. The solution of β -LG was transferred to the cuvette and the far-UV CD spectrum of β -LG recorded. Then an aliquot of each ligand/complex was added to the solution of β -LG to achieve an equimolar amount of protein and ligand/complex and the CD spectrum was recorded immediately.

Figure 56 : Near-uv CD spectra of β -LG and stoichiometric mixtures of β -LG and ligands.



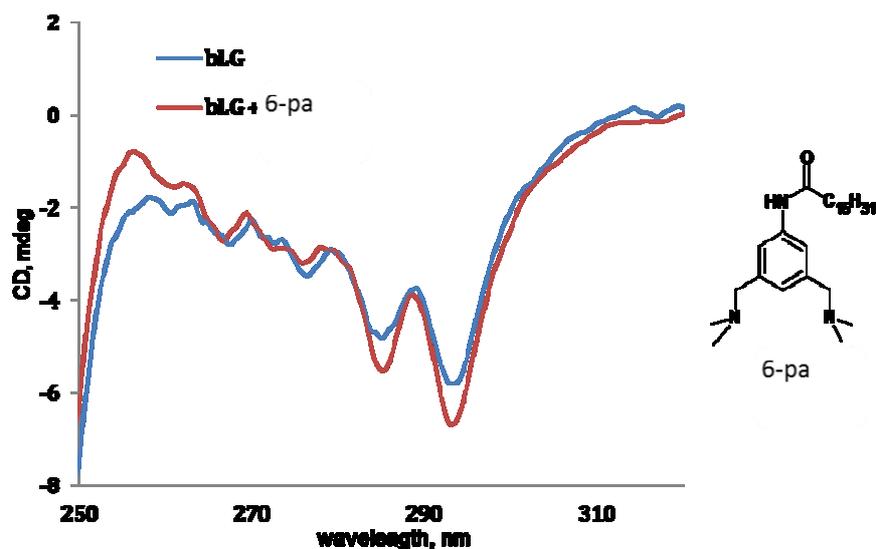
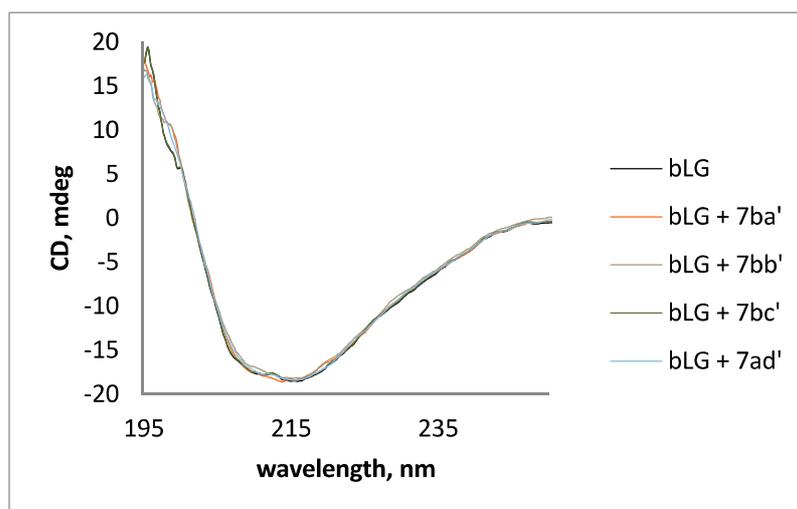


Figure 57 : Far-uv CD spectra of β -LG and stoichiometric mixtures of β -LG and selected complexes.

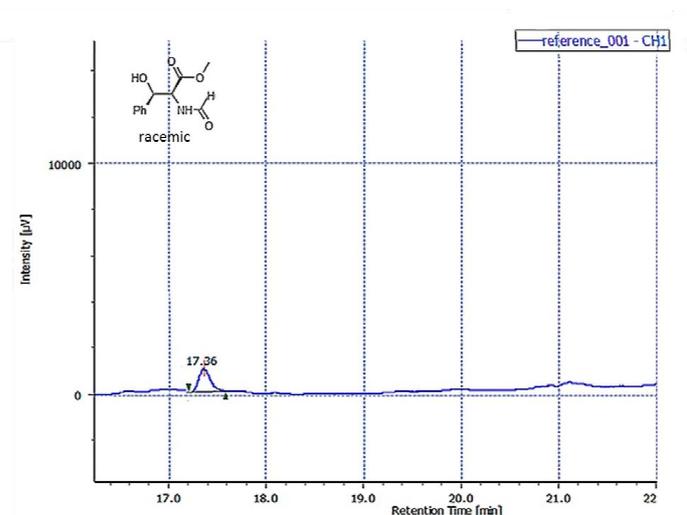


XVII. HPLC analyses

1. Product of aldol condensation between benzaldehyde and methylisocyanoacetate

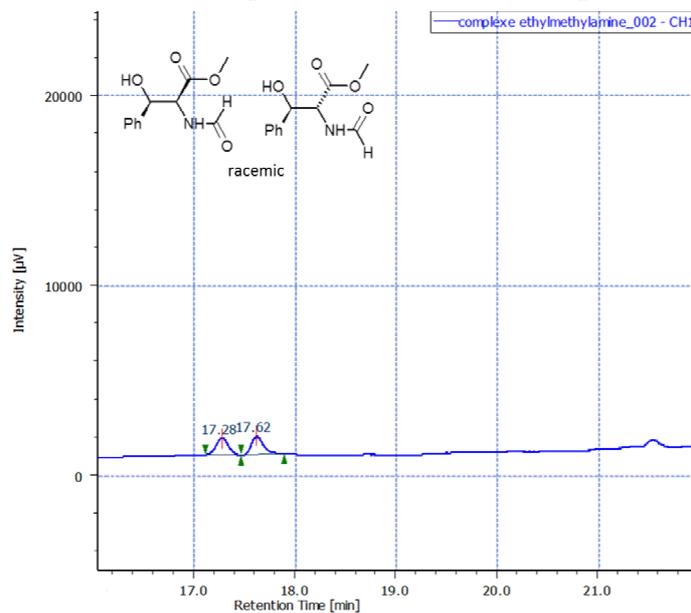
Reaction mixtures were analyzed by RP-HPLC on Nucleosil C18 HTec 4.6 x 150 mm (Macherey-Nagel), applying a gradient of H₂O/MeCN 95/5 to 0/100 in 40 min at 1 ml/min.

Chromatogram of authentic sample (*Trans-isomer*).



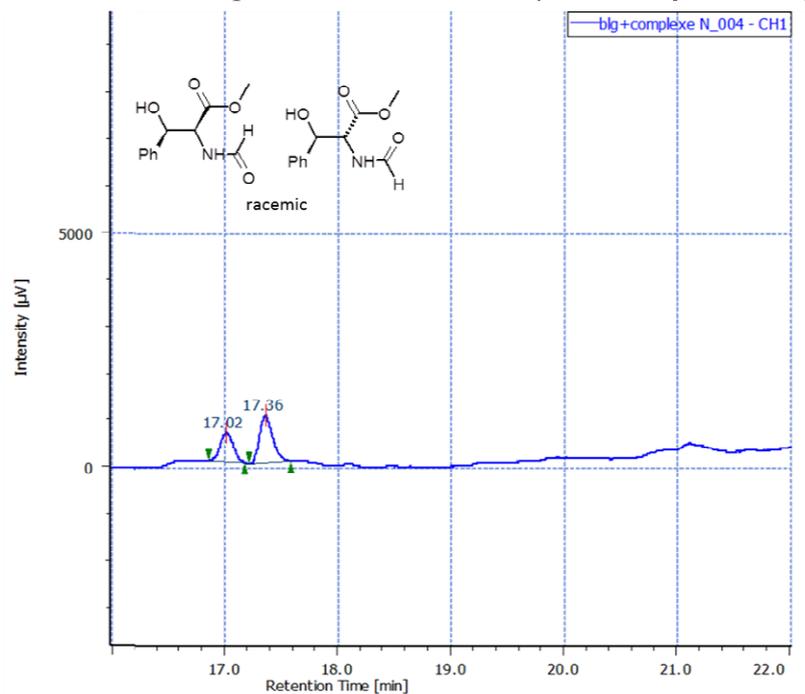
Peaks	Ret. time	Area%
1	17.36	100

Chromatogram of Cis and Trans products obtained with 7-pbas catalyst.



Peaks	Ret. time	Area%
1	17.28	46
2	17.62	54

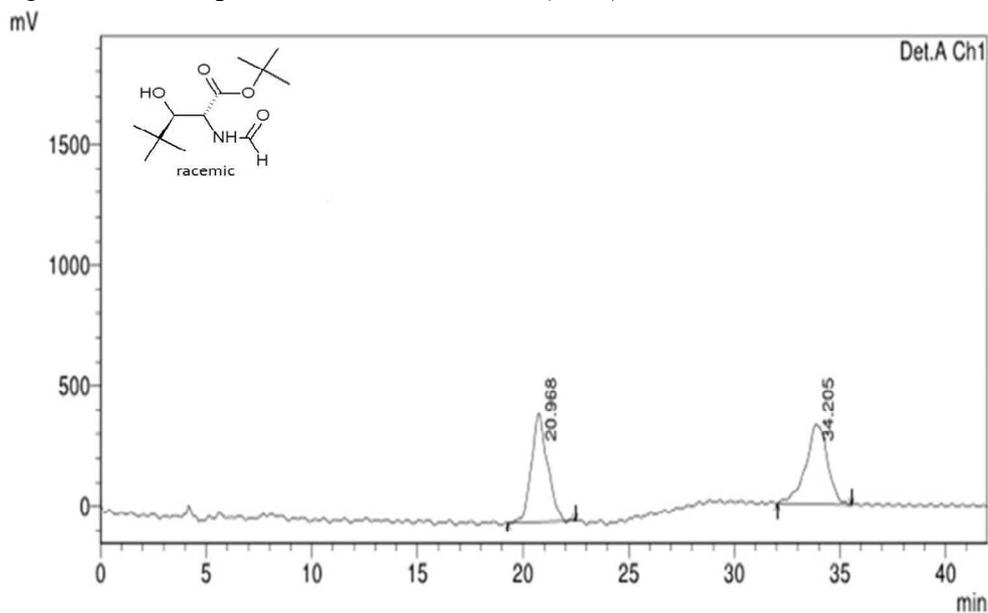
Chromatogram of *Cis* and *Trans* products obtained with β -LG \subset **7-pbas** catalyst.



Peaks	Ret. time	Area%
1	17.02	38
2	17.36	62

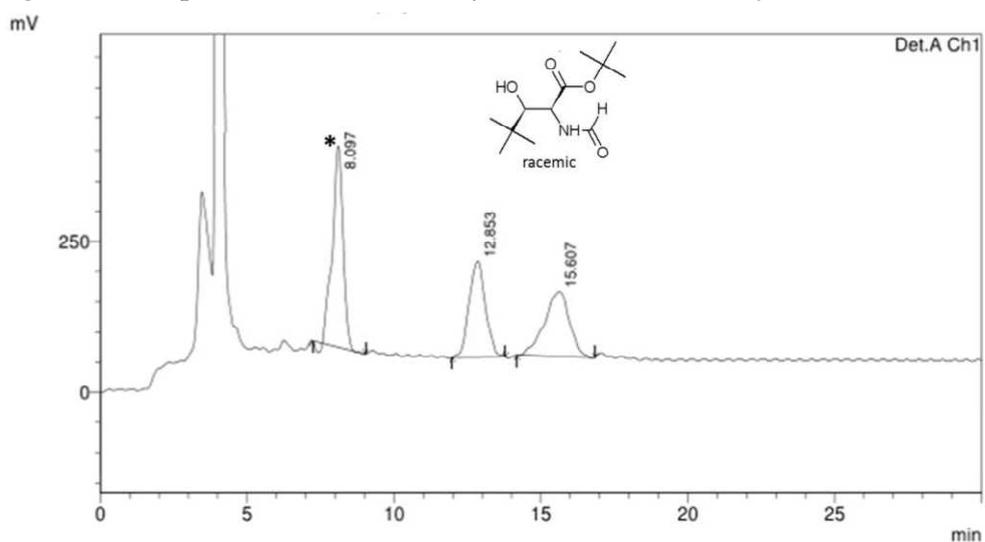
Product of aldol condensation between pivalaldehyde and tert-butylisocyanoacetate
 Compounds were analyzed by chiral HPLC on Kromasil 5-cellicoat, hexane/isopropanol 98/2
 for 19 min then to 96/4 in 11 min at 1 mL/min.

Chromatogram of *Trans* product obtained with Pd(OAc)₂



Peaks	Ret. time	Area%
1	20.96	50
2	34.20	50

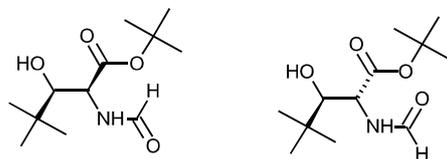
Chromatogram of *Cis* product obtained with β -LG \subset 7-se⁺ as catalyst.



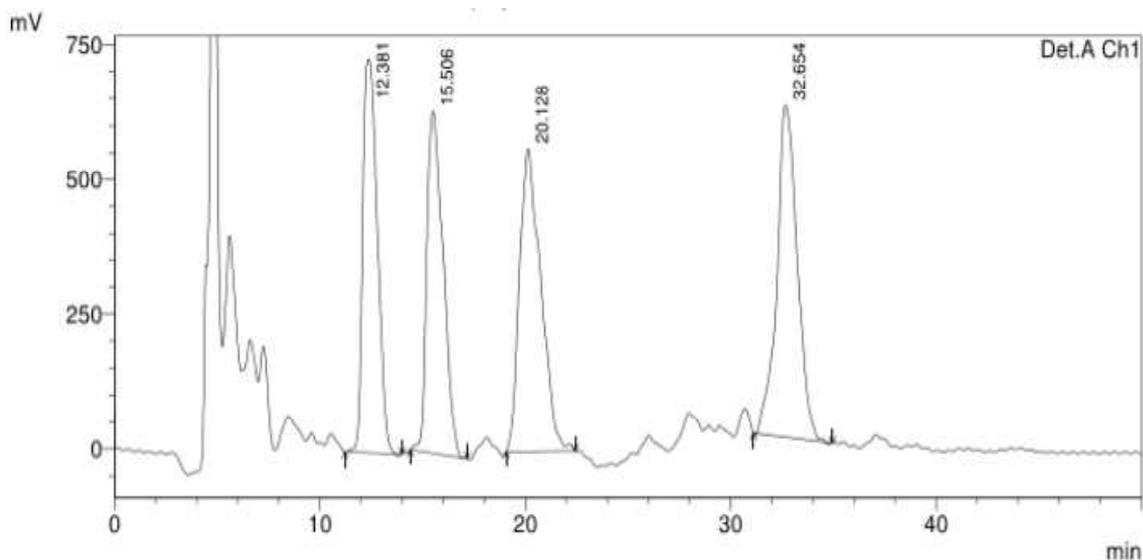
Peaks	Ret. time	Area%
1	12.85	44

2	15.61	56
*	8.1	Tert-butylisocynoacetate

Chromatogram of mixture of *Cis* and *Trans* products obtained with **7-pc⁺** as catalyst.



Cis / *Trans*
Racemic Mixture



Attribution	Peaks	Ret. time	Area%
Cis	1	12.85	23
	2	15.61	23
Trans	3	20.12	26
	4	32.65	28

XVIII. Ultrafiltration

Three samples were prepared in parallel: First (**a**) a solution of aqua complex of **7-pa** (25 μ L of 10 mM solution in MeOH) in 20 mM phosphate buffer pH = 7.5 (0.5 mL).

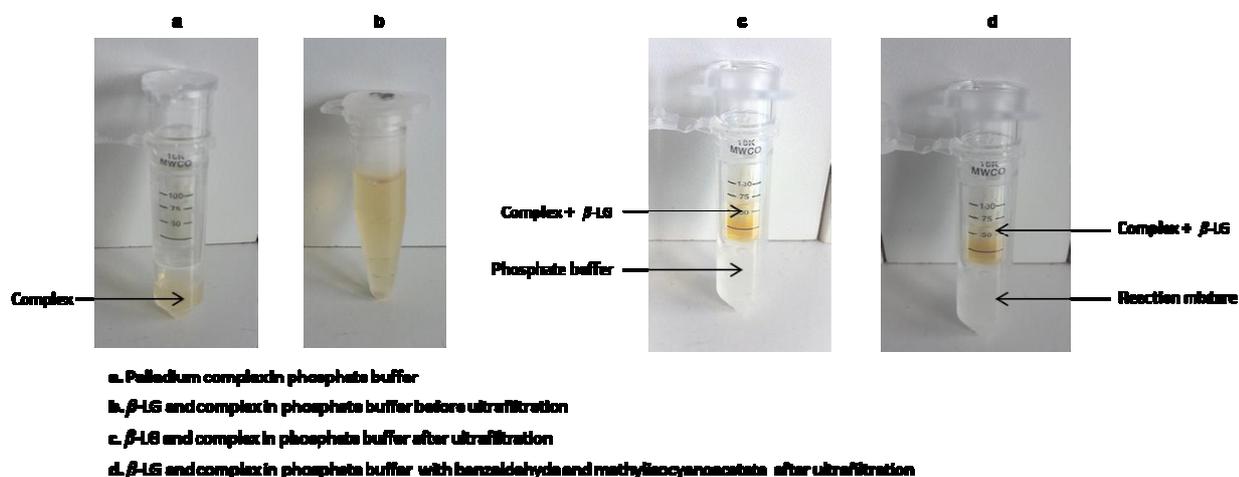
Second (**c**) Beta-LG (10 mg) and a solution of aqua complex of **7-pa** (25 μ L of 10 mM solution in MeOH) in 20 mM phosphate buffer pH = 7.5 (0.5 mL).

Third (**d**) Beta-LG (10 mg, 15 mol%) in 20 mM phosphate buffer pH = 7.5 (0.5 mL). A solution of aqua complex of **7-pa** (25 μ L of 10 mM solution in MeOH, 10% mol) was added and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. Benzaldehyde (25 μ L of 100 mM in DMSO, 2.5 μ mol) and methylisocyanacetate (30 μ L of 100 mM solution in DMSO, 3 μ mol) were added.

All the samples were stirred at room temperature for 6 h. Before filtration, the three solutions were yellow (Figure 57-b). Then the mixtures were transferred into Vivaspin 500 centrifugal filters (10 kDa cutoff) used as ultrafiltration devices and centrifuged in Biofuge primor Heraeus (15000 rpm, 20 min). After 20 min, the samples were photographed as shown in figure 57 (a, c and d).

In sample a, the solution was yellow in both compartments, because the molecular weight of the complex is lower than the filter's cutoff (57-a). For samples c and d, the yellow color was only observed in the upper compartment (57-c and d) because the molecular weight of the metalloprotein (ca. 19 kDa) is higher than the filter's cutoff and the Pd complex forms a supramolecular assembly with the protein. This shows that the metalloprotein formed is stable after reaction and ultrafiltration.

Figure 58



XIX. Size-exclusion chromatography (SEC)

Beta-LG (10 mg, 15% mol) and a solution of aqua complex of **7-pa** (25 μ L of 10 mM solution in MeOH, 10% mol) in 20 mM phosphate buffer pH = 7.5 (0.5 mL) was stirred at room temperature for 6 h. The solution was passed on a prepacked Pierce Dextran Desalting column (10 ml) using water as eluent. Twelve 1-ml fractions were collected and analyzed by

UV between 200 and 350 nm. The absorbance of the fractions at 280 nm was plotted as a function of elution volume. Only the first fractions containing the protein show high absorbance. It shows that the metalloprotein did not dissociate upon SEC and confirms the formation of a high affinity complex between b-LG and **7-pa**.

XX. Fluorescence spectroscopy.

Fluorescence spectra were recorded on a F-6200 spectrofluorimeter (JASCO) at 20°C in a 1 cm pathlength quartz cuvette between 300 and 430 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm) with excitation and emission bandwidth 5 nm, data pitch 1 nm, scanning rate 125 nm/min. A solution of β LG (9.5 μ M in 20 mM phosphate pH 7.5) was transferred to the quartz cuvette and small aliquots of **7-pe** and **7-se** (2 mM in DMSO, 2 μ L) were added sequentially to achieve up to ca. 3 - 4 equiv. of complex. The blank experiment was performed with a solution of N-acetyl-L-tryptophanamide NALTA (9.5 μ M) instead of β LG. The apparent dissociation constant K_d and apparent molar ratio of complex / β LG. The equation of mass law can be expressed as equation (1)

$$(1) P_o \times a = \frac{1}{n} \times R_o \left(\frac{a}{1-a} \right) - \frac{K_d}{n}$$

With P_o the total protein concentration and R_o the total ligand concentration. The a parameter is defined as the fraction of free binding sites; it can be calculated for each data point by applying equation (2)

$$(2) a = \frac{F - F_{\text{min}}}{F_0 - F_{\text{min}}}$$

Where F is the corrected fluorescence intensity at a certain R_o , F_{min} the corrected fluorescence intensity at saturation of the protein binding sites and F_0 is the initial fluorescence intensity. By plotting $P_o a$ vs $R_o(a/(1-a))$, a straight line is obtained with an intercept of $-K_d/n$ and a slope of $1/n$.

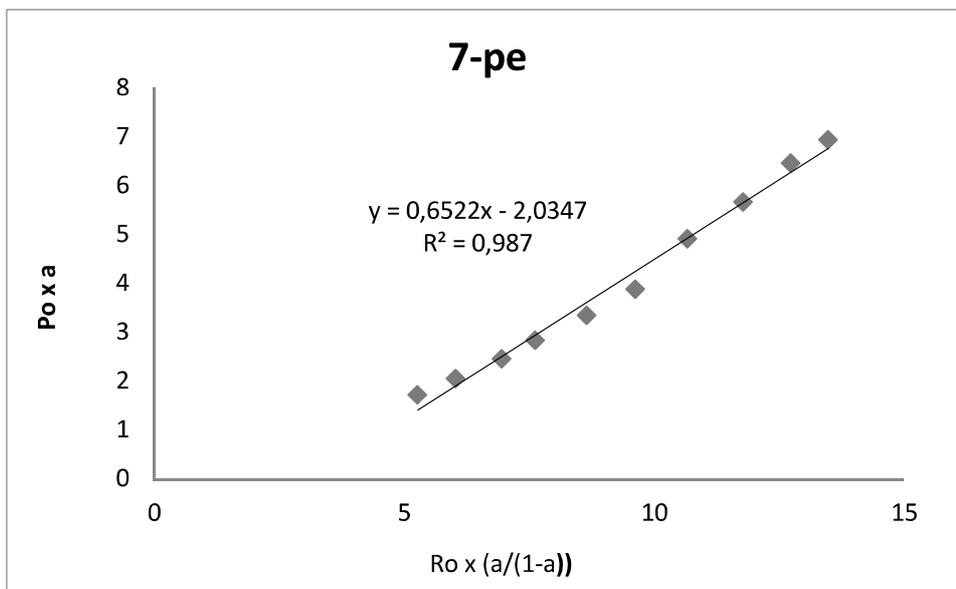


Figure 59 : Linear least-square plot of Equation (1) for the titration of β LG with 7-pe

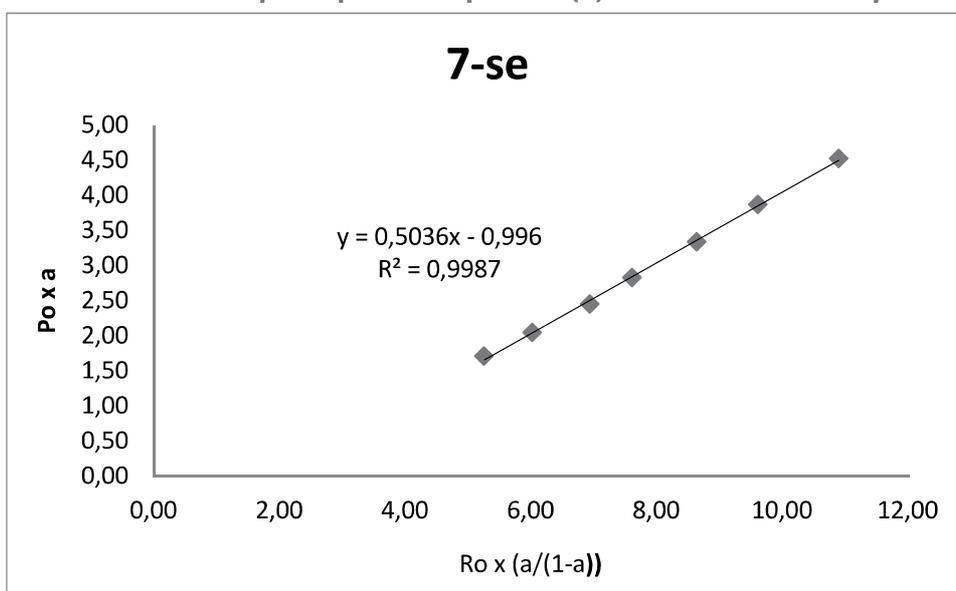


Figure 60 : Linear least-square plot of Equation (1) for the titration of β LG with 7-se

CHAPITRE 3

I. Complexes semi sandwich de ruthénium

Les composés semi-sandwich chiraux sont d'importants représentants dans le domaine de la catalyse de la réaction d'hydrogénation par transfert d'hydrogène. Ils ont fait l'objet de recherches approfondies depuis le tout début de la chimie des métaux de transition. En effet, Brunner et Ganter ont été très actifs dans cette chimie et ont décrit méticuleusement les différentes stratégies pour préparer ces composés et étudier leur stabilité. Après des recherches théoriques initiales, les complexes métalliques chiraux ont reçu un intérêt croissant qui a culminé avec le prix Nobel attribué conjointement à Knowles, Noyori et Sharpless, en 2001, pour leur contribution dans ce domaine. Les complexes semi-sandwich ont trouvé une place privilégiée dans la chimie organométallique.

1. Structure

Les complexes de type arène ruthénium(II) de formule générale $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arène})_2]^{2+}$ ont été découverts en 1957.¹ La chimie des complexes semi-sandwich de ruthénium(II) arène a connu un intérêt croissant depuis le développement de précurseurs synthétiques tels que $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-arène})]_2$.^{2,3} Ces complexes et les composés semi-sandwich associés de formule générale $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-arène})\text{L}]$ et $[\text{RuCl}(\eta^6\text{-arène})\text{L}_2]^+$ sont d'excellents catalyseurs pour une variété de réactions organiques,⁴ parmi lesquelles l'addition d'acides carboxyliques sur des alcynes, l'hydrogénation par transfert de cétones, la polymérisation des oléfines⁵ ou encore l'isomérisation des doubles liaisons.⁶

La découverte par Noyori du complexe très actif de ruthénium(II)-N-(p-toluenesulfonyl)-1,2-diphényléthylenediamine (Figure 61) comme catalyseur pour l'hydrogénation asymétrique par transfert (ATH) a mis à jour l'utilité de ce type de complexe en chimie organométallique. Depuis lors, les complexes $(\eta^6\text{-arène})$ ruthénium ont fait l'objet d'un nombre important d'études pour l'ATH.^{4,7,8}

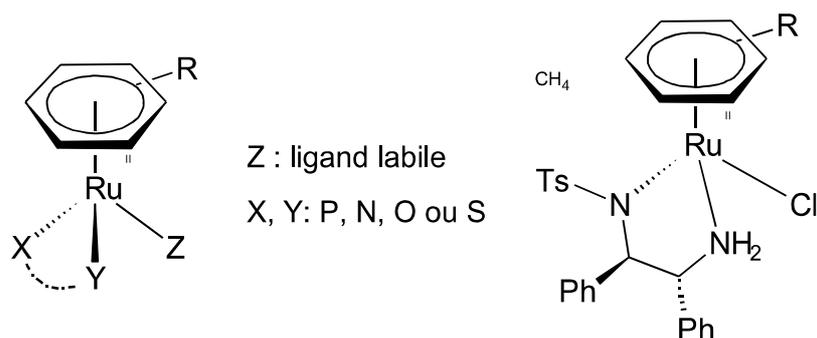


Figure 61 : Complexes semi -sandwich de ruthénium de Noyori (Ru(II) –TsDPEN).

Les complexes analogues comprenant le rhodium(III) ou l'iridium(III) associés au ligand Cp* (pentaméthylcyclopentadienyle) ont été moins étudiés que leurs homologues de ruthénium. Cependant, ces complexes ont trouvé d'importantes applications dans les réactions de réduction asymétrique des cétones et d'imines.⁹ Bien que les complexes Cp*-rhodium aient été principalement décrits dans le contexte de l'hydrogénation par transfert, les catalyseurs Cp*-iridium ont également été employés dans une grande variété de réactions différentes, comme la N-alkylation d'amines¹⁰ ou l'oxydation d'alcools.^{11,12}

Les complexes semi sandwich de ruthénium, rhodium et iridium affichent des caractéristiques intéressantes telles que la stabilité à l'air et à l'eau qui explique leur rôle central dans le développement de la chimie verte.

2. Réaction ATH d'arylcétones

Une des réactions importantes capables d'être catalysée par les complexes semi-sandwich de ruthénium est l'hydrogénation asymétrique par transfert (ATH). Ce type de réaction est apparu comme une alternative pratique à l'hydrogénation classique car elle permet d'éviter l'utilisation de H₂, plus dangereuse. L'ATH s'est montrée particulièrement efficace pour la préparation d'alcools secondaires chiraux, qui sont d'importants intermédiaires dans la synthèse d'autres composés.¹³ Sa découverte en 1925, avec la réduction de Meerwein-Ponndorf-Verley (MPV) a été le premier exemple de transfert d'hydrogénation d'un groupe carbonyle.¹⁴ Depuis, la majorité des recherches réalisées dans ce domaine repose sur l'utilisation de complexes semi-sandwich de Ru(II)-arène ou Ir(III) / Rh(III)-Cp* comme espèce métallique et portant des ligands phosphine ou aminosulfonamide optiquement actifs.^{15,16,17,18} L'ATH de cétones a beaucoup été influencé par la découverte du catalyseur Ru(II)-TsDPEN **1** (voir la figure 1) par Noyori,¹⁹ ce complexe présente une large portée de

substrats et fournit des alcools optiquement actifs avec une énantiosélectivité et un rendement élevés.

La source d'hydrogène la plus courante pour l'ATH de cétones est l'isopropanol en présence de base. Cependant, les mélanges d'acide formique et de triéthylamine sont de plus en plus utilisés car ils conduisent à la formation irréversible de $\text{CO}_{2(g)}$ lors de la génération de l'hydrure métallique favorisant la réduction irréversible de la cétone.^{19,20} L'utilisation du formiate dans l'eau a été rapportée pour la première fois par Xiao et al. Lors de leurs recherches, ils ont montré que des complexes ruthénium semi-sandwich à ligands N,N ou N,O étaient capables de réaliser des réactions ATH dans l'eau, sur une large gamme de substrats avec des conversions atteignant 99% et des excès énantiomériques allant jusqu'à 95 %.²¹ Une limitation de ces procédés est la décomposition du catalyseur lorsque des concentrations élevées d'acide formique sont utilisées.²² Les ligands hydrosolubles et l'addition de tensioactifs ont contribué au développement des réactions d'hydrogénation par transfert en milieu aqueux.^{23,24} Enfin, les vitesses de réduction sont considérablement plus rapides en utilisant HCOONa que l'azéotrope $\text{HCOOH} / \text{Et}_3\text{N}$ ou $\text{iPrOH} / \text{KOH}$.²⁵

3. Hénilabilité

Des études ont été faites sur la stabilité de complexes métalliques à ligand N,S et ont montré une certaine labilité de la liaison Ru-S permettant un équilibre entre les différents diastéréoisomères.

Dans les travaux de Zenneck et coll.,²⁶ il a été synthétisé des complexes cationiques de ruthénium présentant un ligand β -aminothioether chiral. Ainsi, trois centres stéréogènes sont présents : au niveau des atomes de ruthénium, de soufre et de l'atome de carbone benzylique du ligand chélaté. Le complexe de ruthénium η^6 -p-cymène forme deux diastéréomères uniquement avec un atome de soufre épimérisable, un centre stéréogène défini au niveau du ruthénium. La configuration du carbone asymétrique sur les ligands chélate reste stable dans toutes les conditions appliquées dans ces travaux. Ces complexes ont été étudiés en RMN et par spectroscopie CD et ont révélé que le ruthénium et le soufre peuvent s'épimériser en solution. Un équilibre entre les diastéréomères est alors observé.

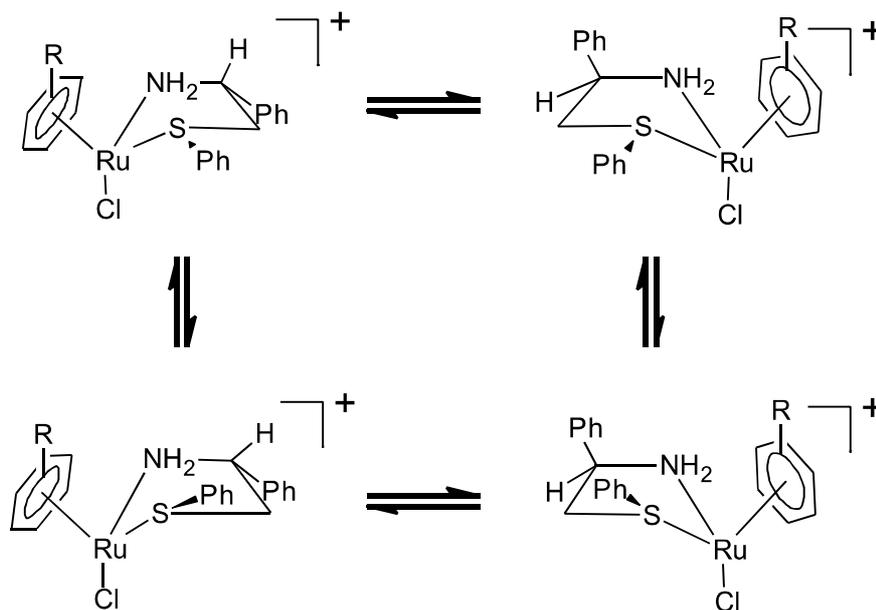


Figure 62 : Equilibre entre les différents complexes de ruthénium cationiques en solution.

Ces complexes de ruthénium η^6 -p-cymène et η^6 -mésitylène ont été testés comme catalyseurs pour l'hydrogénation par transfert d'acétophénone dans de l'isopropanol en conditions basiques. Ils ont montré une certaine activité mais pas d'énantiosélectivité.²⁶

4. Catalyse avec des complexes N, S

En 2006, l'équipe de Hamaker a synthétisé une série de complexes de ruthénium cationiques semi-sandwich à partir de la réaction de $[(\eta^6\text{-p-cymène})\text{RuCl}_2]_2$ avec différentes bases de Schiff N,S dérivées de la 2-(méthylthio)aniline. Tous les complexes de ruthénium ont été caractérisés par spectroscopie IR, RMN ^1H et UV / Vis. Les ligands de type base de Schiff ont été envisagés pour la catalyse malgré leur sensibilité vis-à-vis de l'hydrolyse lors de la coordination avec le centre de ruthénium cationique (II).²⁷

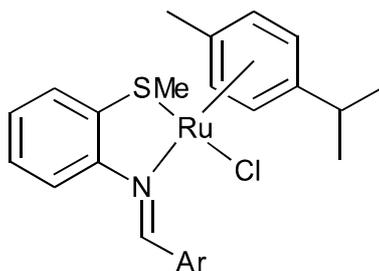


Figure 63 : Complexes de ligand base de Schiff N, S.

Par la suite, des complexes semi-sandwich de ruthénium, rhodium et iridium comportant l'acide 2-((2-pyridyl)méthylthio)benzoïque comme ligand N,S ont été synthétisés et caractérisés par RMN. Ces composés sont hydrosolubles, en raison de la présence d'un groupe -COOH dans le ligand et ils catalysent efficacement l'hydrogénation par transfert de composés carbonylés dans l'eau en utilisant du glycérol comme donneur d'hydrogène. L'insensibilité des trois complexes à l'air et à l'humidité est un avantage supplémentaire. Le glycérol a été exploré pour l'ATH dans l'eau pour la première fois dans ces travaux. L'efficacité catalytique la plus élevée a été trouvée pour le complexe de Rh, et il n'y a aucune preuve de formation de nanoparticules dans le processus catalytique, qui semble être homogène. La formation d'une liaison M-H a favorisé un mécanisme classique d'hydrogénation par transfert.²⁸

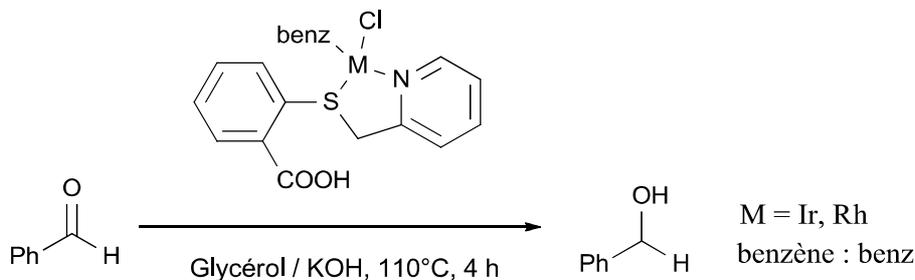


Schéma 33 : Réduction d'acétophénone

En 2015, l'équipe de Peter Buglyo a été montré que des acides aminés portant un atome de soufre tel que la S-méthyl-L-cystéine et la DL-méthionine sont des ligands efficaces dans des complexes de ruthénium semi-sandwich sur une large gamme de pH en solution aqueuse.

Les complexes ont été caractérisés par RMN, spectrométrie de masse, ainsi que par diffraction X et ont indiqué que dans le cas du ruthénium, les ligands sont coordonnés par les trois

atomes donneurs [S, N, O]. La stabilité légèrement plus élevée avec la méthionine $[(\eta^6\text{-p-cym})\text{Ru}(\text{met})]^+$ a été rationalisée par des liaisons plus flexibles avec le ruthénium.

En 2017, des dérivés de cystéine ont été utilisés comme ligands pour la formation de complexes de ruthénium et d'iridium. Des complexes neutres, ainsi que monoanioniques ont été synthétisés.²⁹

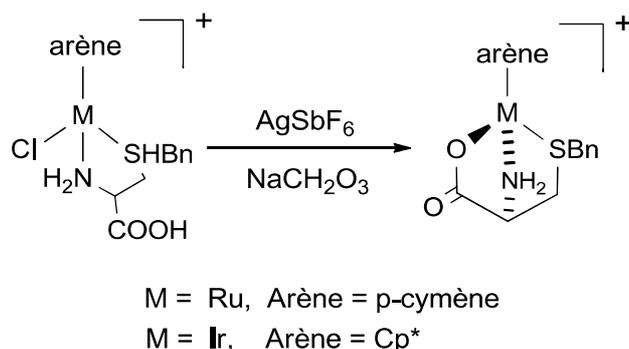


Schéma 34 : Complexes de ruthénium et d'iridium à partir de dérivés de cystéine.

Le métal, le carbone asymétrique du dérivé de cystéine et, dans certains cas, les atomes de soufre et d'azote sont des centres stéréogènes. Dans la plupart des cas, la configuration absolue des complexes a été déterminée, en solution, par spectroscopie RMN et CD. Dans les complexes d'iridium, le déplacement chimique des protons des méthyles du Cp* établit une discrimination entre les modes de coordination bidentée et tridentée. Le déplacement chimique du carbone du méthylène est utile pour connaître l'inclusion ou non de ce groupe dans les métallocycles. Dans le cas du ligand tridenté N,S,O, si la configuration de la cystéine est R alors celle-ci va forcer la configuration du métal qui sera dans ce cas identique à celle du carbone et donc exclusivement R.

Dans les complexes où le ligand à base de cystéine est coordonné de manière tridentée N,S,O, si la configuration de la cystéine est R alors celle-ci va forcer la configuration du métal qui sera dans ce cas identique à celle du carbone et donc exclusivement R. La configuration de l'atome de soufre est régie par la gêne stérique entre les substituants C₅Me₅ et benzyle dans les métallocycles formés et l'épimérisation au soufre nécessite moins d'énergie pour les complexes d'iridium que pour les analogues du ruthénium. Enfin, dans le complexe d'iridium, les paramètres thermodynamiques pour l'épimérisation du soufre ont été déterminés.

5. ArMs – pour ATH

Les caractéristiques attrayantes des complexes semi-sandwich de ruthénium ont également été exploitées pour créer une nouvelles classe de catalyseur: les métalloenzymes artificielles. Les exemples les plus réussis à ce jour d'ATHases artificielles ont été obtenus en utilisant le système streptavidine / biotine. Ward et coll. ont ainsi décrit une gamme de complexes semi-sandwich biotinylés (Ru, Rh et Ir)^{30, 31} pour générer des ArMs à base de streptavidine pour l'hydrogénation par transfert de cétones.³² En examinant un certain nombre de cofacteurs et de protéines hôtes, il a été possible d'identifier des ArMs catalysant la réduction sélective de cétones, y compris des dialkylcétones, avec une énantiosélectivité modérée à excellente.³² Des améliorations supplémentaires ont été apportées en introduisant des mutations ponctuelles sur la streptavidine au niveau de la Lys121 et de la Leu124 qui se trouvent à proximité du centre métallique.³³

Sur la base de leur expérience sur l'ATH des cétones,³³ le groupe de Ward s'est concentré sur l'ATH des imines. Ces expériences ont révélé que l'hybride [Cp*Ir(Biot-p-L)Cl] / streptavidine était un catalyseur prometteur.³¹ Les deux énantiomères de la réduction de l'imine prochirale 6,7-diméthoxy-1-méthyl-3,4-dihydroisoquinoline peuvent être obtenus par une seule mutation ponctuelle sur la S112 de la streptavidine. Le produit (R) a été obtenu avec une sélectivité jusqu'à 96 % ee après mutation de la sérine 112 en glycine ou alanine. En revanche, les résidus cationiques (lysine ou arginine) à cette position ont donné des sélectivités (S), jusqu'à 78 % ee. Sur la base des données de rayons X, la Lys121 a été identifiée comme jouant un rôle dans l'étape de la protonation et de réduction de la cétone et de l'imine qui se déroule à travers le même mécanisme.

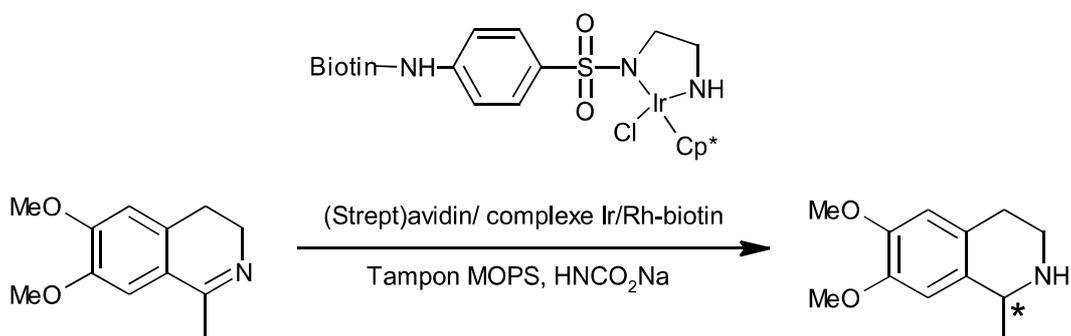


Schéma 35 : ATH de dihydroisoquinoline avec un complexe hybride de (strept)avidine.

Ensuite, l'activité de l'ATHase artificielle a encore été améliorée.³⁴ L'introduction de résidus

lipophiles (R84A-S112A-K121A) dans le site actif a entraîné une augmentation de l'efficacité catalytique par rapport à la streptavidine de type sauvage comme hôte et une augmentation de 2 fois par rapport au complexe Ir seul. Cependant, seuls des ee modérés ont été obtenus.

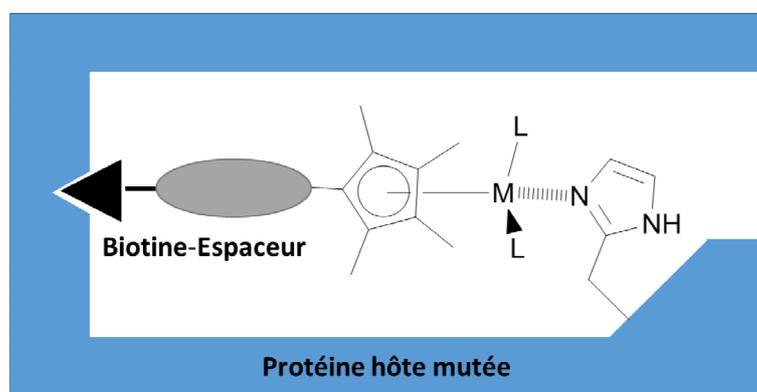


Figure 64 : Nouvelle approche d'insertion de complexe dans la (strept)avidine.

Dans une approche alternative, basée sur des calculs, une histidine a été introduite dans l'échafaudage de la streptavidine aux positions 112 et 121, respectivement, pour activer et localiser le complexe métallique par la formation d'une liaison dative supplémentaire avec le métal.³⁴ Les structures modélisées ont été confirmées par la cristallographie aux rayons X. Les deux énantiomères de la réaction d'hydrogénation ont été obtenus jusqu'à 55 % ee pour l'énantiomère S et 79 % ee pour l'énantiomère R, en fonction de la position du résidu histidine. En outre, la nouvelle métalloenzyme artificielle a montré un turnover multiplié par six par rapport à la streptavidine de type sauvage.

Il a été démontré que l'ATHase composée d'un $[Cp^*Ir(Biot-p-L)Cl]$ combiné avec la streptavidine, était encore actif lorsqu'il était encapsulé dans des polymersomes biocompatibles.³⁵ Ce système est resté actif et s'est révélé stable dans des conditions physiologiques pendant plusieurs mois, suggérant un potentiel d'applications dans les cellules. L'ancrage d'une entité $IrCp^*(N,N)$ dans l'anhydrase carbonique humaine (II) génétiquement optimisée (hCAII) a fourni une ArM capable de catalyser l'hydrogénation du 1-méthyl-6,7-diméthoxy-3,4-dihydroisoquinoline et former la salsolidine avec une bonne activité et des excès énantiomériques jusqu'à 68 %.³⁶

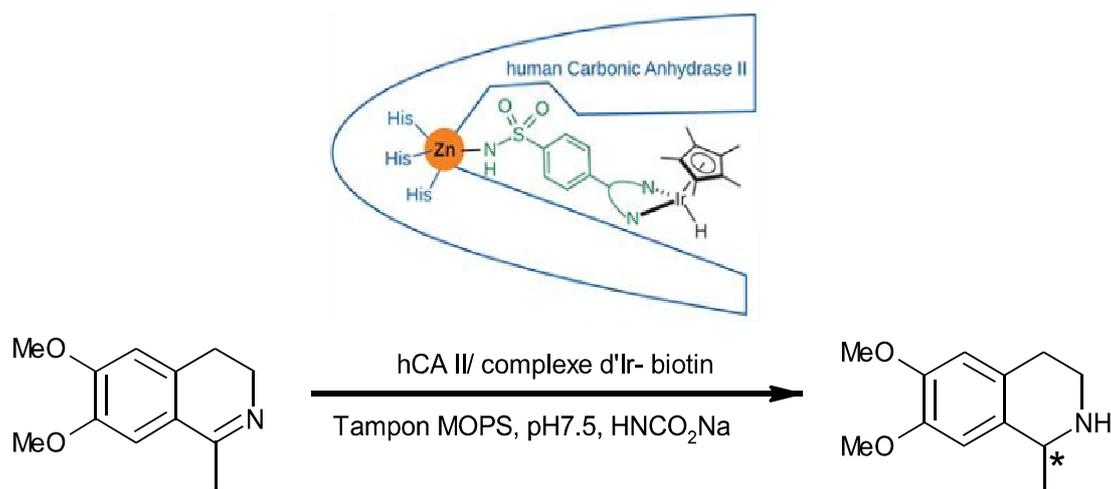


Schéma 36 : ATH d'imine avec l'anhydrase carbonique humaine.

Enfin en rappel de ce qui a déjà été dit dans le chapitre 1, des complexes de Ru(II) et Rh(III) avec des ligands 2,2'-dipyridylamine achiraux équipés d'une longue chaîne aliphatique ont été ancrés de manière supramoléculaire dans la β -lactoglobuline bovine (β -Lg)(Schéma 37).³⁷ Lors de ces recherches réalisées au laboratoire, ces hybrides n'ont permis la réduction que de la trifluoroacétophénone (TFACP) avec des ee modérés (inférieur à 32 %) obtenus en utilisant des solutions de formiate. Néanmoins, ces complexes ont démontré l'utilisation possible de la β -Lg comme protéine hôte.

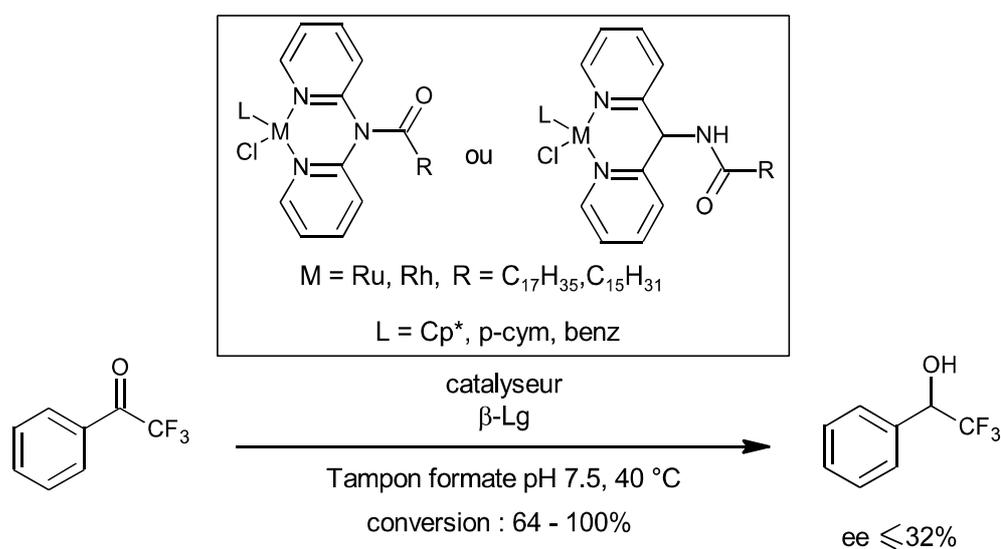


Schéma 37: Réaction d'hydrogénation par transfert asymétrique de la trifluoroacétophénone catalysée par les premières métalloenzymes dérivées de la β -lactoglobuline.

En se basant sur ces travaux, il a été envisagé de synthétiser de nouveaux complexes semi-sandwich de ruthénium à base de ligands N,S fonctionnalisés par une chaîne aliphatique pour permettre leur insertion supramoléculaire dans la protéine (Figure 65). En effet, comme il a été montré par l'étude bibliographique précédente ci-dessus, leur réactivité en milieu aqueux semble d'une part prometteuse, ce qui pourrait augmenter la liste de substrats potentiels, mais aussi les différents stéréoisomères des complexes de ruthénium N,S sont en équilibre entre eux grâce à la labilité de la liaison Ru-S. Cette labilité pourrait favoriser l'insertion préférentielle d'un des stéréoisomères du complexe dans la β -Lg, et ainsi déplacer l'équilibre vers la formation d'un hybride unique grâce à l'influence de la seconde sphère de coordination de la protéine et ainsi permettre d'augmenter la sélectivité par rapport aux travaux précédents.

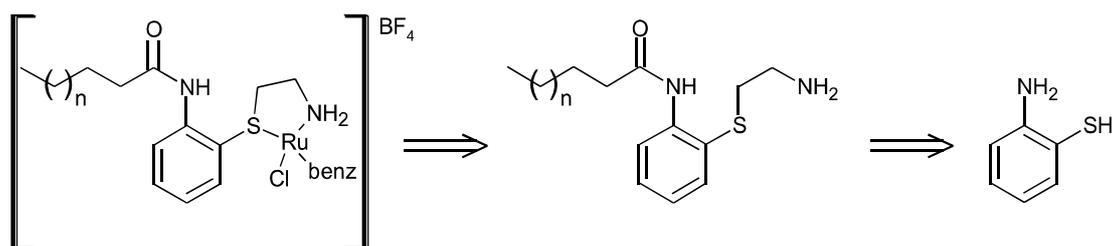


Figure 65 : Rétrosynthèse des complexes envisagés.

II. Synthèse des ligands

Pour commencer cette synthèse, le 2-aminothiophenol **21** a été choisi. En effet comme pour le précurseur des ligands à pinces, ce composé possède une amine permettant l'introduction de la chaîne aliphatique pour cibler la cavité hydrophobe de la protéine et une fonction thiol permettant la mise en place d'une chaîne latérale fonctionnalisée qui viendra chélater le ruthénium. Pour commencer cette synthèse, le *tert*-butyl(2-bromoéthyl)carbamate est utilisé pour fonctionnaliser le soufre et obtenir la pince S-N nécessaire à la complexation du métal.

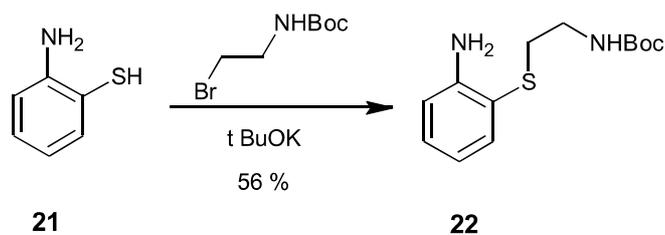


Schéma 38 : fonctionnalisation du soufre.

Ensuite pour préparer le composé **23** avec différentes longueurs de chaîne, l'amine **22** est mise en présence des chlorures d'acide correspondants dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'hydrogénocarbonate de sodium. Ainsi les composés **23-l**, **23-p** et **23-s** sont obtenus avec des rendements allant de 68 à 82 %.

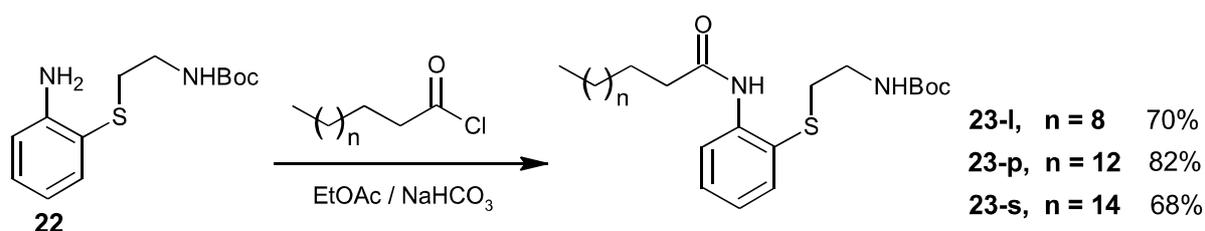


Schéma 39 : Insertion des chaînes aliphatiques.

Enfin les ligands **24** sont obtenus par déprotection de l'amine à l'aide d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane à température ambiante. Les trois composés **24-l**, **24-p** et **24-s** sont obtenus avec des rendements allant de 80 à 90%.

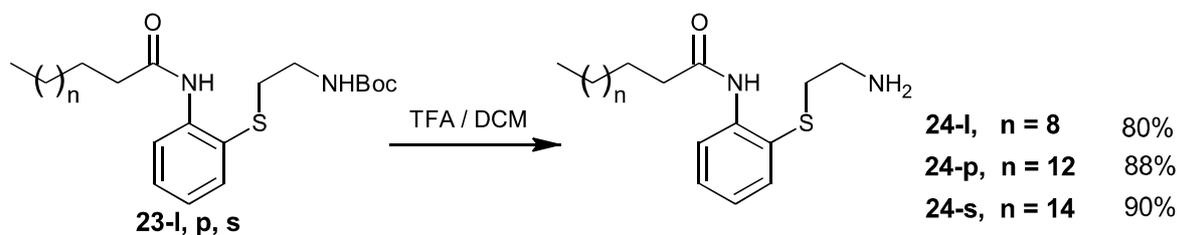


Schéma 40 : Déprotection du groupement amine des composés 24.

III. Préparation des complexes

Afin de concevoir de nouveaux complexes de ruthénium avec une activité catalytique potentielle dans la réduction des cétones, nous avons décidé de synthétiser les complexes arène ruthénium (II) des ligands **24**. Les complexes N, S créent des possibilités supplémentaires par rapport aux N, N et N, O-chélates, puisque l'atome de soufre devient stéréogénique lorsqu'il est coordonné au métal et présente des caractéristiques électroniques et de polarité différentes.

1. Série Benzène

Pour réaliser la synthèse des complexes de ruthénium, $[(\eta^6\text{-benzene})\text{Ru}(\mu\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ a été utilisé comme précurseur. Le clivage du pont chloré du dimère par le ligand et le traitement par NH_4BF_4 permet la formation des complexes **25-la**, **25-pa** et **25-sa** avec des rendements corrects. La complexation avec le ruthénium permet la création de deux centres stéréogènes au niveau du ruthénium et du soufre. Cependant, sur le spectre RMN ^1H des complexes **23-l**, **23-p** et **23-s** un seul diastéréoisomère semble être présent. Le fait que l'on ait la possibilité d'un échange rapide et d'une épimérisation du soufre, permet de penser qu'à température ambiante nous nous trouvons là où il y a coalescence des pics.

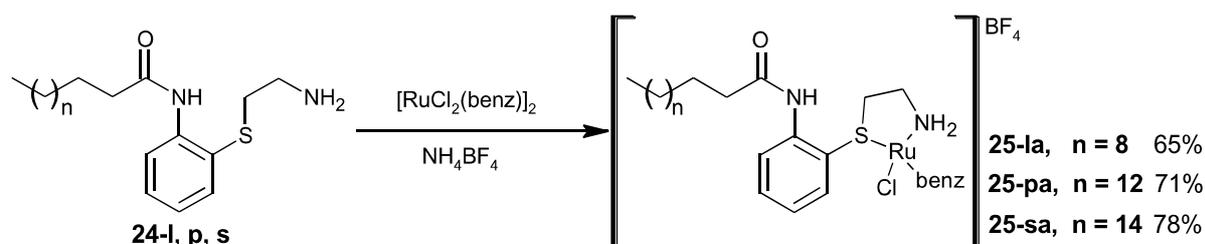


Schéma 41 : Formation des complexes de ruthénium benzène.

En regardant les spectres RMN du ^1H de plus près, on constate un déblindage des NH_2 qui présentent un pic très large aux alentours de 3,90 ppm. Après complexation du ligand avec le ruthénium ces protons ont subi un déblindage de 2,2 ppm par rapport au ligand **24-p** seul. Un léger déblindage des protons NH_2CH_2 de 0,6 ppm est également observé. Une inéquivalence des CH_2 S est aussi remarquée avec un proton couplant avec le massif des NH_2CH_2 à 2,82 ppm et un deuxième massif beaucoup plus large à 3,07 ppm. On a pu constater la diastérotomie de ces protons grâce à une expérience HSQC qui montre le couplage d'un seul

carbone avec le signal de deux protons différents (Figure 66). Comme attendu, la complexation du soufre avec le ruthenium provoque sa transformation en centre stéréogène et donc une diastéréotopie au niveau du CH₂ adjacent. Une autre indication de cette complexation est l'apparition du pic à 5,71 ppm correspondant au CH du benzène. Enfin ce phénomène est retrouvé pour les complexes **25-la** et **25-pa**.

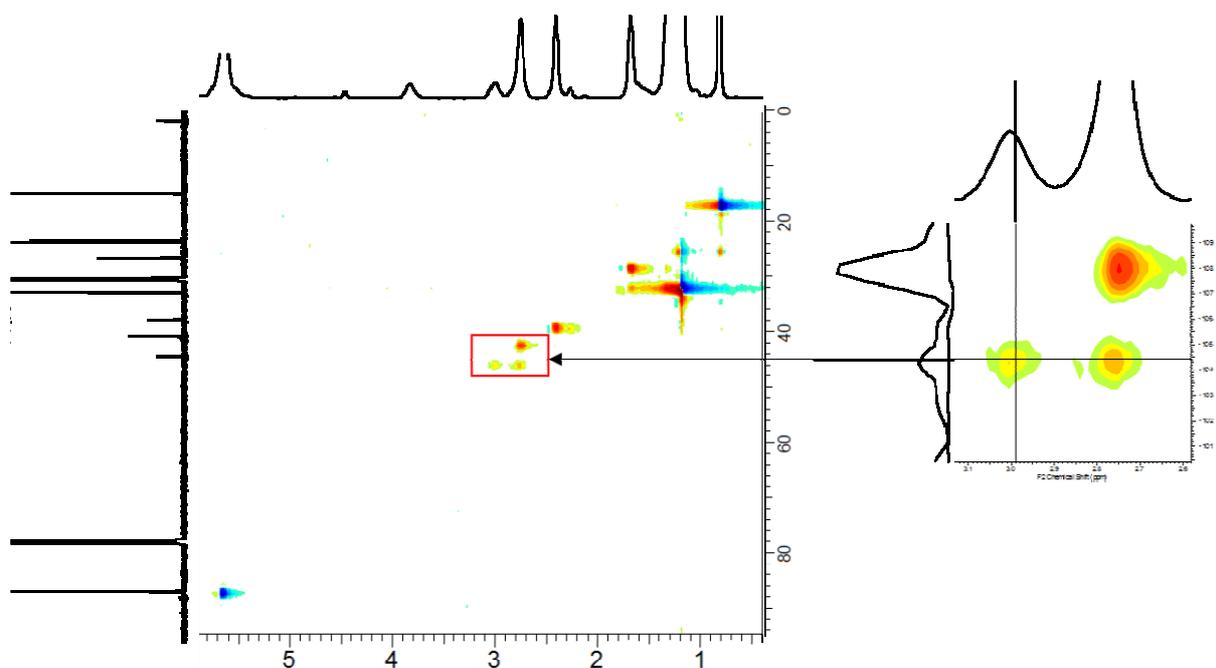


Figure 66 : Analyse HSQC du complexe 25-pa.

2. Changement de ligand arène

Afin de connaître l'influence du ligand arène sur la réactivité des espèces, les complexes avec le mésitylène (mes) et le p-cymène (p-cym) à la place du benzène ont été synthétisés. De la même manière que précédemment les dimères [Cl₂Ru(mes)]₂ et [Cl₂Ru(p-cym)]₂ sont utilisés pour complexer les ligands **24-l** et **24-p** (mes) ou **24-s** (p-cym).

Après l'ajout de NH₄BF₄ les différents complexes sont obtenus avec des rendements allant de 58 à 60 % (Schéma 42). De la même manière que précédemment, en RMN ¹H des complexes **25-lb**, **25-pb** (mes) et **25-pc** (p-cym), un seul diastéréoisomère est observé avec une diastéréotopie très visible au niveau du CH₂ adjacent au soufre.

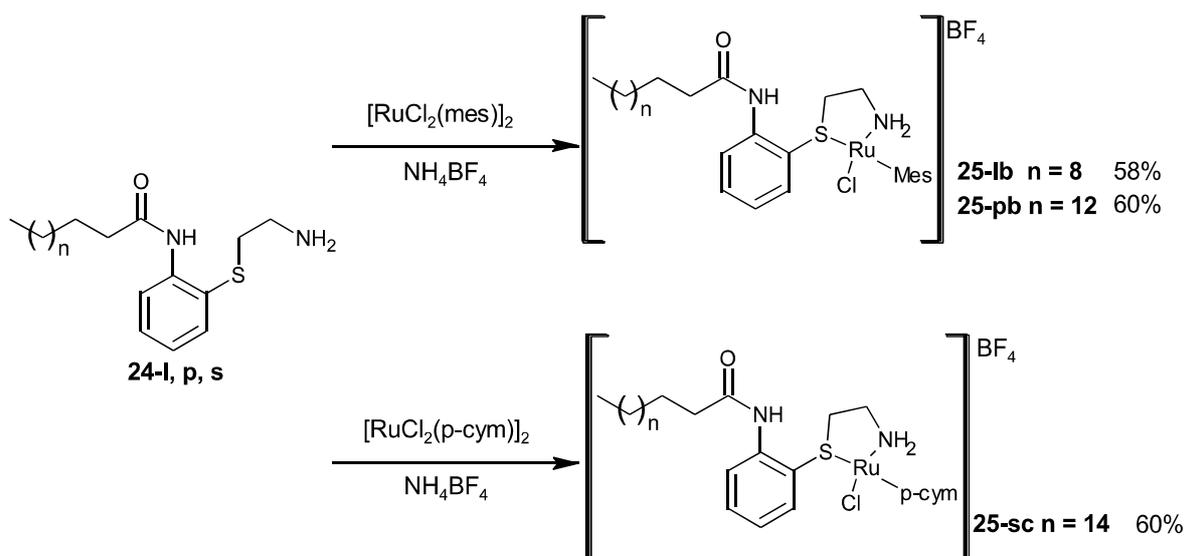


Schéma 42 : Formation des complexes de ruthénium mésitylène et du complexe de ruthénium p-cymène.

Pour les complexes **25-lb** et **25-pb**, l'apparition de pics à 5,67 ppm correspondant aux protons aromatiques du mésitylène et à 1,36 ppm correspondant aux CH₃ est observée confirmant la formation du complexe, avec le déblindage des protons de NH₂ et la diastéréotopie du CH₂ adjacent au soufre.

De la même manière pour le complexe **25-pc**, 4 signaux des protons aromatiques du p-cymène apparaissent entre 5,30 et 5,95 ppm, le CH à 2,69 et un CH₃ se trouvent à 2,15 ppm alors que les deux autres CH₃ du p-cymène sortent à 1,38 ppm avec les CH₂ de la chaîne aliphatique.

3. Changement au niveau du soufre

Afin de créer une nouvelle classe de ligands, l'oxydation du soufre du ligand **24-p** a été effectuée par 1 équivalent de H₂O₂ afin d'éviter la formation de sulfone. L'oxydation du soufre va permettre la formation d'un mélange racémique des deux énantiomères de **26-p**. La présence d'une fonction sulfoxyde aura un effet sur les propriétés électroniques du ligand. En outre, la sulfoxydation n'ajoute pas seulement un nouveau substituant, mais également un changement dans le centre stéréogène qui sera formé avec le ruthénium. En effet il n'y aura plus d'équilibration possible lors de la complexation de l'atome de soufre avec le ruthénium et cela sera important lors de l'insertion dans la protéine (voir paragraphe I-3).

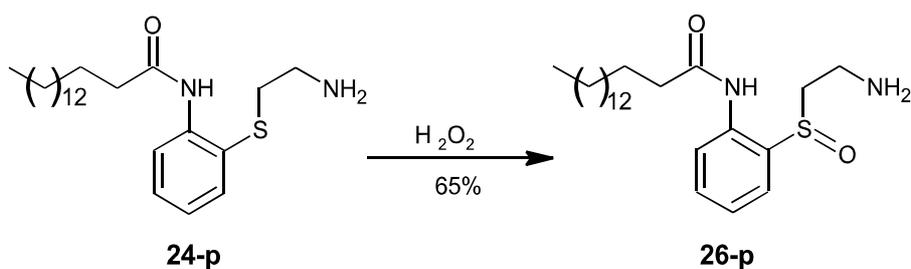


Schéma 43 : Oxidation du soufre du ligand 24-p

La formation du ligand sulfoxyde produit un très léger déplacement au niveau de la RMN ^1H , cependant l'infrarouge a permis de lever le doute sur la formation du ligand **26-p**, en révélant la présence d'un pic caractéristique de la fonction sulfoxyde à 1030 cm^{-1} qui confirme sa formation. Il en va de même avec la masse qui correspond bien à celle du composé voulu.

Dans les conditions précédentes, le clivage du pont chloré du dimère de ruthénium par le ligand **26-p** et le traitement par NH_4BF_4 permet la formation du complexe **27-pa** mais avec un rendement moyen. De nouveau, la complexation du ruthénium forme un centre asymétrique supplémentaire au niveau du ruthénium. Le ligand **26-p** a été synthétisé de manière racémique et la présence de l'oxygène à cette position devrait empêcher l'équilibre entre les différents diastéréoisomères de se faire, ainsi lors de l'ajout de la protéine les hybrides formés seront incapables d'évoluer vers un hybride unique seule la seconde sphère de coordination devrait être responsable de la sélectivité dans ce cas. A première vue, on peut se dire que le ruthénium pourrait se complexer soit au doublet non liant du soufre soit à l'oxygène. Néanmoins, par analogie avec la littérature^{38, 39} où des complexes de ruthénium incluent des ligands sulfoxydes, la structure RX de ces composés indique la liaison par le doublet non liant du soufre.

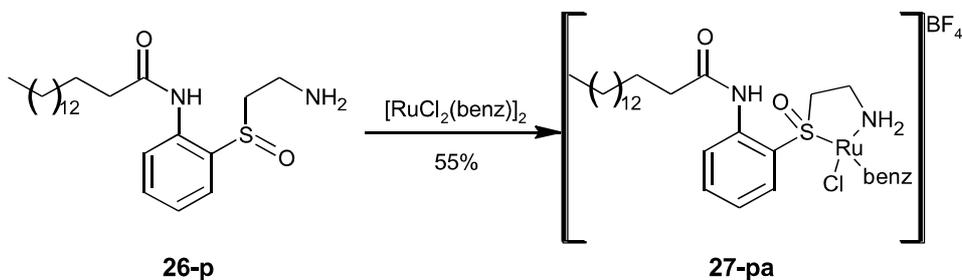


Schéma 44 : Formation du complexes de ruthénium benzène 27-pa.

Sur le spectre RMN ^1H du complexe **27-pa**, une seule série de pics est observée avec une diastéréotopie au niveau du CH_2 adjacent au S et un déblindage du NH_2 .

IV. Insertion dans la protéine

1. Analyse par Dichroïsme circulaire.

La première analyse réalisée pour vérifier l'insertion des ligands et des complexes dans la protéine est le dichroïsme circulaire (CD). Comme on a pu le voir précédemment, pour la β -Lg native en milieu aqueux la zone étudiée va de 400 à 250 nm et on espère que l'insertion du chromophore dans la protéine provoquera un changement permettant d'observer un changement au niveau du spectre CD. L'insertion d'un chromophore dans la β -Lg peut induire un changement au niveau du spectre CD causé par la présence du chromophore dans l'environnement chiral de la protéine (effet extrinsèque) ou par perturbation de l'environnement des résidus aromatiques (effet intrinsèque).

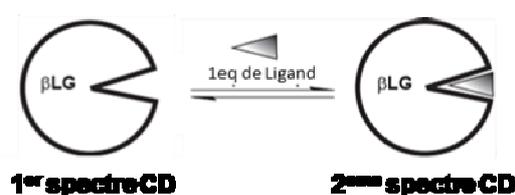


Figure 67 : Association entre la protéine et le ligand par CD

Lors des premières mesures avec les complexes **25-la**, **25-pa**, et **25-sa**, un changement modeste est observé après ajout d'un équivalent de complexe dans une solution de β -Lg à $\text{pH} = 7,5$. Les spectres de CD des mélanges de β -Lg et de complexes (**25-la** et **25-pa**) sont très proches de celui de la β -Lg seule (Figure 68) mais une augmentation légère du signal est observée entre 250 et 280 nm qui se trouve être la zone d'absorption des complexes et l'on peut aussi constater une perte du pic à 285 nm dû à la présence du tryptophane.

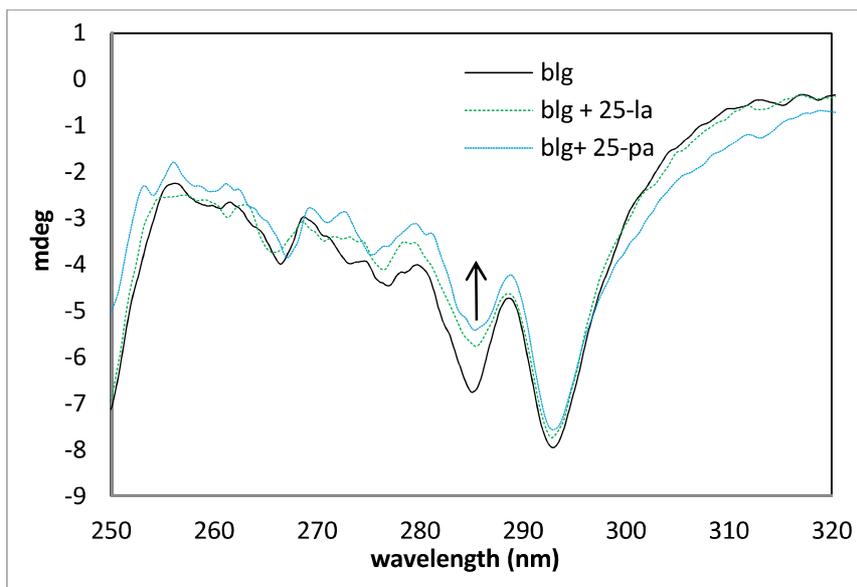


Figure 68 : Spectre CD du mélange de β -Lg et des complexes cationiques 25-pa et 25-la'

Pour les complexes **25-la** et **25-pa**, il semble que l'effet observé soit un effet intrinsèque (un changement d'environnement des acides aminés aromatiques et notamment des tryptophanes de la protéine) car le changement principale du spectre CD après ajout des complexes est la diminution du pic du tryptophane, il semble donc que ce changement soit principalement dû à un changement d'environnement des acides aminés aromatiques et notamment des tryptophanes de la protéine.

A l'inverse, le complexe **25-sa** semble induire une légère décroissance du signal entre 250 et 280 nm (Figure 69). Cette expérience montre que le complexe s'insèrent dans la protéine, même si le changement au niveau du spectre CD reste assez peu marqué.

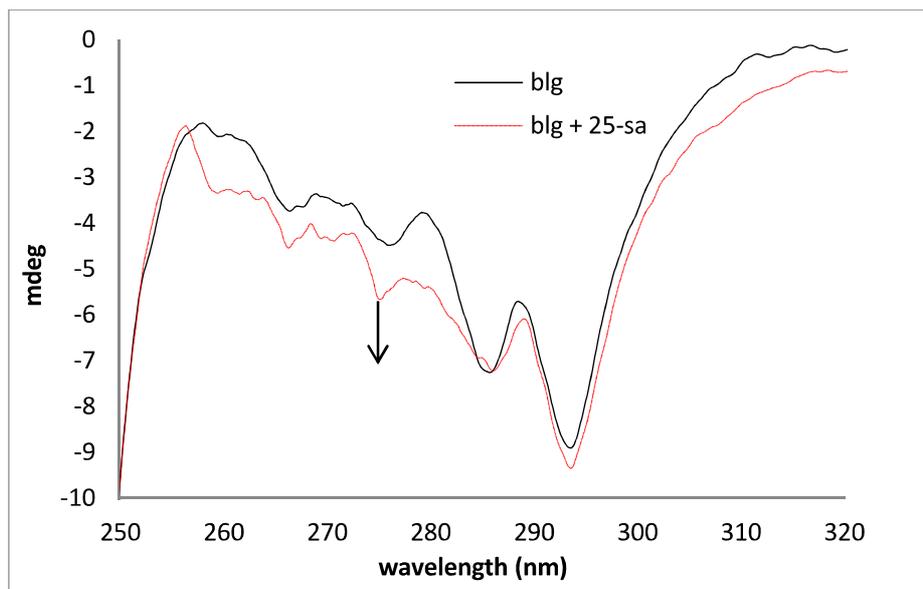


Figure 69 : Spectre CD du mélange de β -Lg et du complexe cationique 25-sa.

Cette modification du spectre semble cette fois être due principalement à un effet extrinsèque, ce qui est montré par la diminution du signal au niveau de la zone d'absorption du complexe **25-sa**. Au vu des différents résultats obtenus en CD, il semble que les complexes **25-la**, **25-pa** et **25-sa** s'associent bien à la β -Lg.

2. Fluorescence

Nous avons également appliqué le titrage par fluorescence pour étudier l'assemblage des complexes métalliques **25-la**, **25-pa** et **27-pa** à la β -Lg et déterminer éventuellement la constante d'association. L'insertion des complexes a été évaluée en suivant le quench de la fluorescence de la β -Lg avec les longueurs d'onde d'excitation et d'émission fixées respectivement à 296 nm et 337 nm.

On ajoute progressivement 0,1 équivalent de complexe (2 μ L d'une solution à 1 mM dans DMSO) à une solution de β -Lg (10 μ M) dans du tampon phosphate à pH = 7,5. Après chaque addition de ligand, la solution a été mise sous agitation pendant 15 min afin de laisser le mélange s'équilibrer avant l'enregistrement de l'intensité de fluorescence. L'addition suivante de complexe n'a pas été effectuée avant que le signal de fluorescence de l'addition précédente n'atteigne un niveau constant. On peut voir que la position du maximum d'émission de la β -Lg est proche de 337 nm et l'intensité de fluorescence de la β -Lg diminue quand la concentration de **25-la**, **25-pa**, ou **27-pa** augmente graduellement. Après calcul, on a constaté que l'intensité de fluorescence de β -Lg a diminué de 85%, 90% et 60% au maximum pour **25-**

la, 25-pa et **27-pa** respectivement. À la fin des différents titrages, la concentration en DMSO reste inférieure à 2% et est donc supposée n'avoir aucun effet sur le système. De plus, dans toute la gamme des concentrations étudiées, les solutions sont demeurées claires sans turbidité détectable. Comme expérience de contrôle, une solution de N-acétyl-L-tryptophanamide (NATAL) ayant une absorbance à 296 nm égale à celle de la protéine a été utilisée. Ce composé possède une fluorescence semblable à celle de la protéine, mais il ne doit pas interagir avec les complexes **25**. Le complexe a été ajouté à cette solution exactement de la même manière que la solution de protéine et l'intensité de fluorescence enregistrée. Après ajout des complexes une diminution linéaire de la fluorescence est observée.

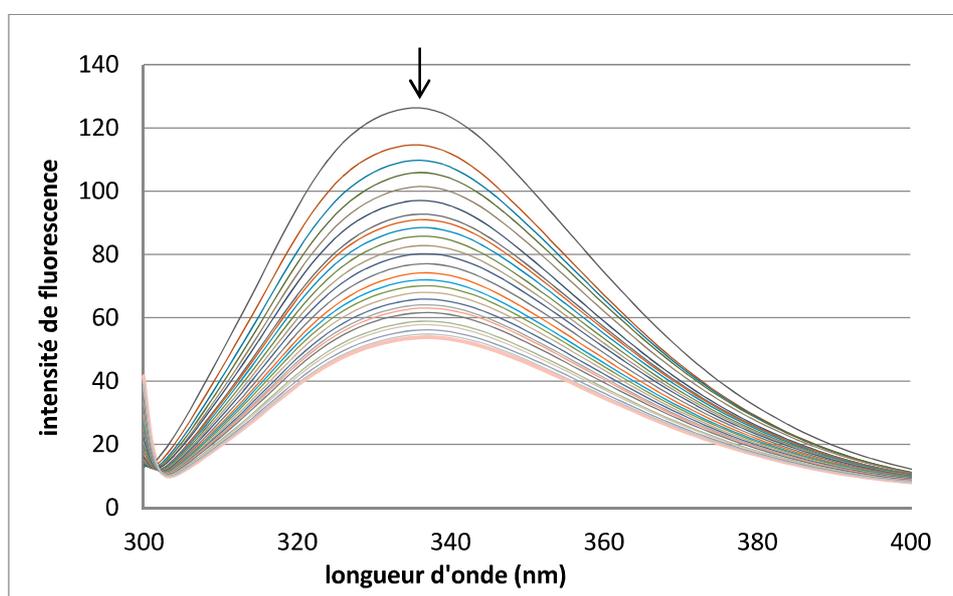


Figure 70 : Fluorescence de la β -Lg en présence du complexe de ruthénium 27-pa

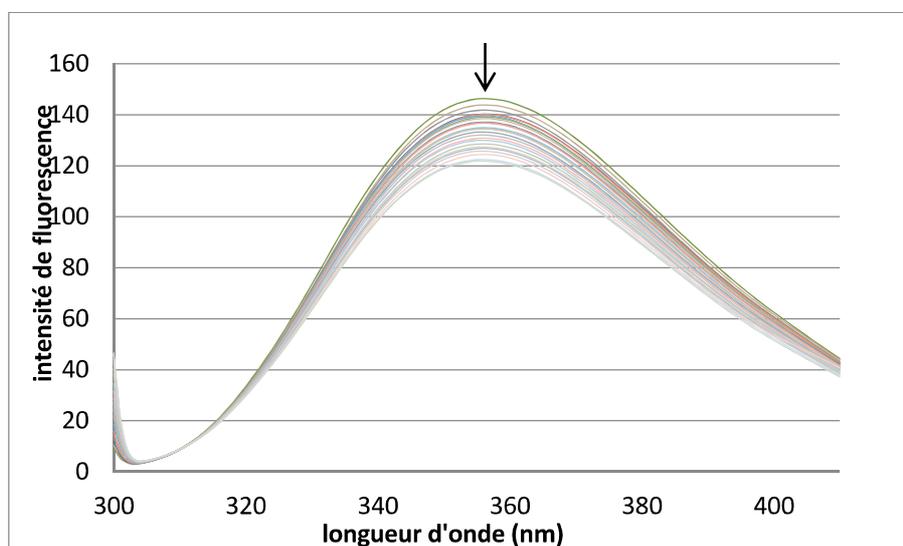


Figure 71 : Fluorescence du NATAL en présence du complexe de ruthénium 27-pa

Dans le cas du complexe laurique **25-la** une forte diminution jusqu'à 65 % après correction, est observée aux environs de 2 équ., la fluorescence se stabilise pour atteindre un plateau (Figure 72). Les constantes de dissociation apparentes K_d et les rapports de liaison « n » ont été déduits des données de fluorescence selon Cogan et al.⁴⁰ La constante de dissociation K_d et le nombre de sites de liaison « n » peuvent être déterminés en fonction de l'équation (2) présentée précédemment. Pour le complexe **25-la**, le K_d obtenu est égal à 1,01 μM avec $n = 1,6$. La constante de dissociation calculée est plus élevée que celle obtenue pour l'acide laurique correspondant avec la même méthode de mesure⁴¹ ($K_d = 0,7$, $n = 0,86$). Cependant dans le cas du complexe **25-la**, le « n » est supérieur à 1, ce qui pourrait suggérer l'insertion du complexe dans le deuxième site d'insertion de la β -Lg.

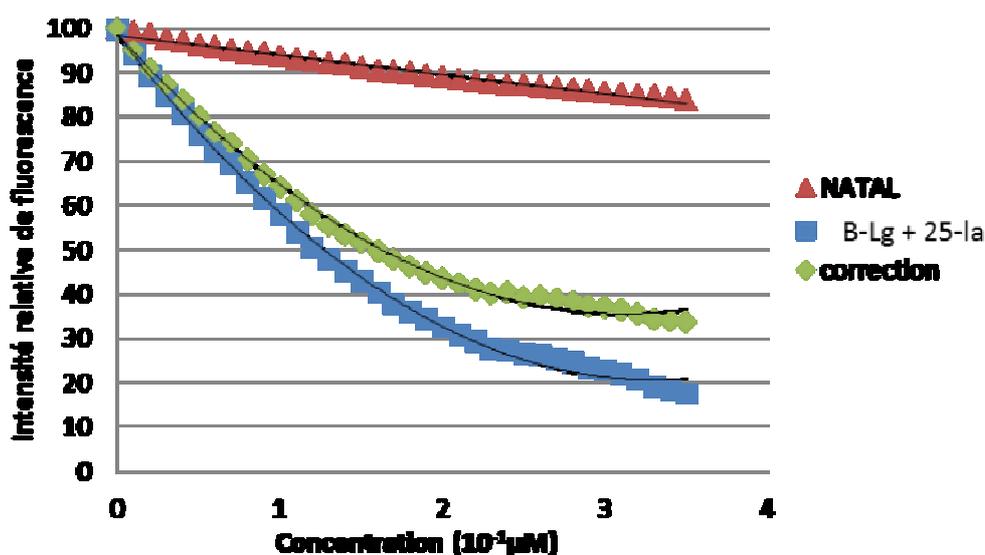


Figure 72 : Fluorescence de la β -Lg et de NATAL en présence de 25-la

Pour le complexe palmitique **25-pa**, on observe une diminution de la fluorescence jusqu'à 75 % après correction, jusqu'à environ 2 équivalents (Figure 73). Après différents calculs, une constante de dissociation $K_d = 1,52 \mu\text{M}$ avec un $n = 1,19$ est calculé. Lorsque ces résultats sont comparés à l'acide palmitique correspondant, on constate que le K_d du complexe **25-pa** est plus élevé avec une valeur de 1,52 μM contre 0,10 μM pour l'acide palmitique, néanmoins dans le cas du complexe **25-pa**, n est proche de 1, il semble que ce complexe s'insère principalement dans le β -barrel.

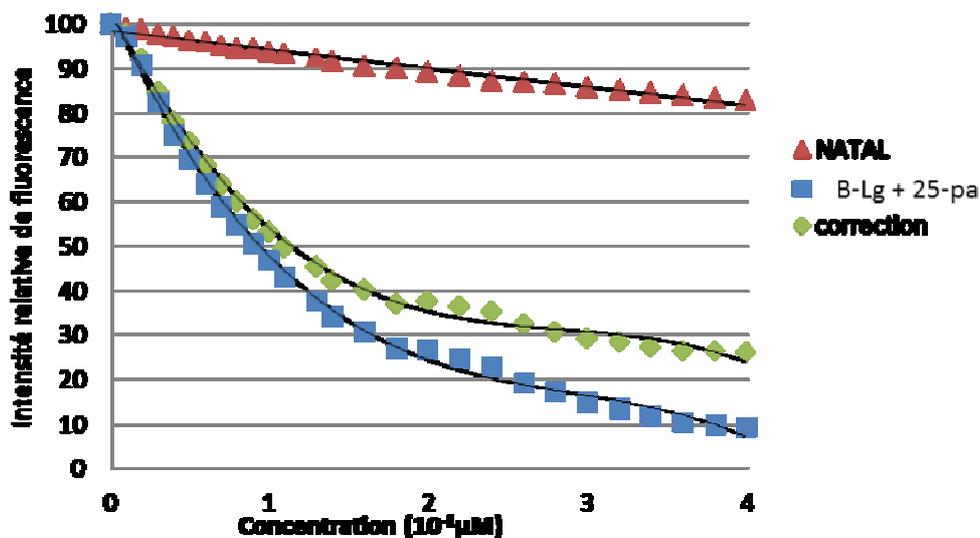


Figure 73 : Fluorescence de la β -Lg et de NATAL en présence de 25-pa

Pour le complexe palmitique **27-pa**, on observe une diminution de la fluorescence jusqu'à 40 % après correction, jusqu'à environ 1,5 équivalents (Figure 74). Après différents calculs, une constante de dissociation $K_d = 0,98 \mu\text{M}$ avec $n = 0,97$ sont calculés. Lorsque ces résultats sont comparés à l'acide palmitique correspondant, on constate que le K_d du complexe **27-pa** est plus élevé, néanmoins dans le cas du complexe **27-pa** le n est proche de 1, il semble que ce complexe s'insère principalement dans le β -barrel.

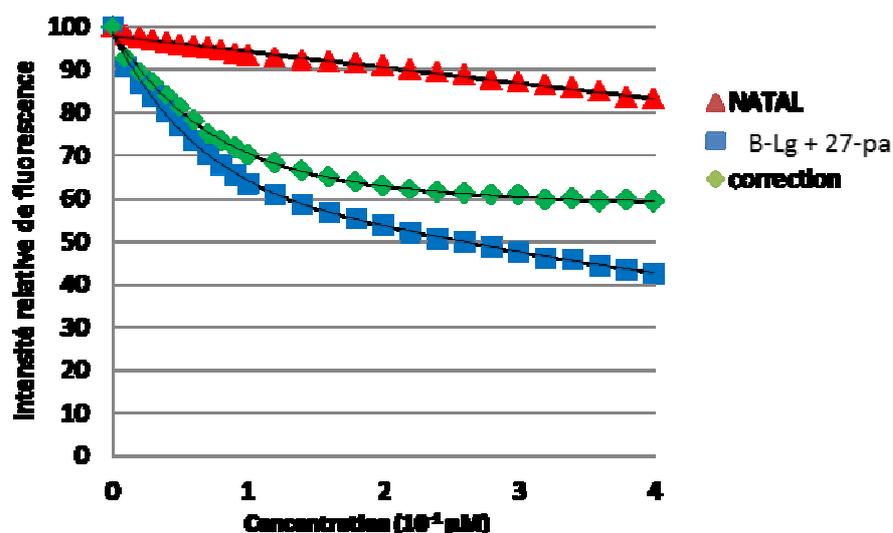


Figure 74 : Fluorescence de la β -Lg et de NATAL en présence de 27-pa

Au vu des résultats obtenus, les K_d suivent l'ordre suivant **25-pa** > **25-la** > **27-pa**. Les complexes **25-pa**, **25-la** et **27-pa** se lient à la β -Lg avec des constantes de dissociation qui sont supérieures à celle des acides gras correspondants (

Tableau 6). Par conséquent, la présence de la tête organométallique volumineuse attachée à la queue lipidique diminue l'affinité par rapport aux acides gras seuls. En résumé, les études CD associées à la spectroscopie de fluorescence a fourni des indices solides de l'association de presque tous les complexes **25-pa**, **25-la** et **27-pa** à la β -Lg.

Tableau 6 : K_d des complexes et des acides gras correspondants.⁴¹

	K_d (μ M)	Stœchiométrie (n)
25-la	1,01	1,6
25-pa	1,52	1,19
27-pa	0,98	0,97
Acide palmitique	0,10	0,93
Acide laurique	0,70	0,86
Acide stéarique	0,12	0,89

V. Réactivité des complexes

a. Mise au point des conditions de réduction

Nous nous sommes donc intéressé à l'utilisation des hybrides β -Lg \subset **25** en catalyse de réduction par transfert de cétones aromatiques.

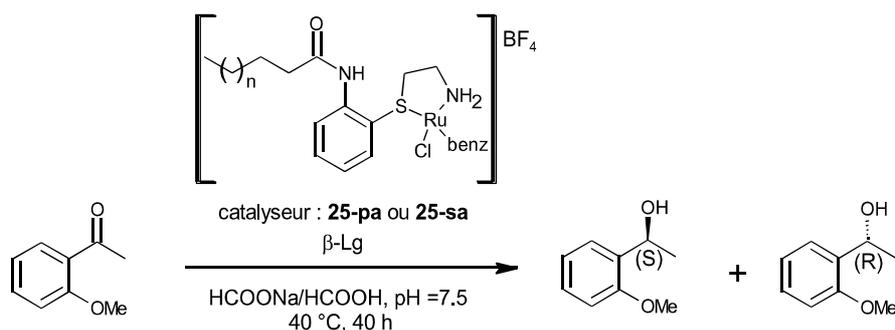


Schéma 45 : Réduction de la 2-méthoxyacétophénone par les complexes **25-la, **25-pa** et **25-sa** en présence de β -Lg**

Les résultats de l'étude préliminaire sur la 2-méthoxyacétophénone sont reportés dans le Tableau 7. L'activité catalytique du complexe **25-sa** a d'abord été testée en l'absence de protéine. Pour cela, 1,5 mol% de **25-sa** sont introduits dans 1 mL de solution de formiate 1 M

puis 1,67 μmol de 2-methoxyacétophénone sont ajoutés et la réaction est laissée sous agitation pendant 48 h à 40 °C (entrée 1 du Tableau 7). On constate que le complexe **25-sa** catalyse la réaction d'hydrogénation avec une bonne conversion de 85%. Comme attendu, le complexe **25-sa** se trouvant sous forme racémique, il n'y a aucune sélectivité apportée par le complexe.

Tableau 7 : ATH de la 2-methoxyacétophénone en fonction du temps et de la concentration en 25-sa, β -Lg \subset 25-pa ou β -Lg \subset 25-sa

Entrée ^a	β -Lg (mol%)	Complexe	Quantité (mol%)	Temps (h)	Conversion ^b (%)	e.r. ^b S : R
1	0	25-sa	1,5	48	85	50 : 50
2	1,5	25-sa	1,5	48	82	75 : 25
3	0,2	25-pa	0,15	48	52	62 : 38
4	0,2	25-pa	0,15	96	64	61 : 39
5	2	25-pa	1,5	24	20	75 : 25
6	2	25-pa	1,5	48	67	89 : 11

^a La réaction est réalisée pendant 48 h à 40°C dans une solution de formate 1M.

^b Déterminé par GC, avec une Colonne: CP-Chirasil-DEX CB (25m x 0,25mm x 0,25 μm), injecteur : 250°C, split ratio 20; FID detector: 250°C; carrier gas: N₂, 1 mL/min.

La réaction a été réalisée en présence de β -Lg en faisant varier la concentration de catalyseur ainsi que le temps de réaction. Dans un premier temps, une concentration de 1,5 mol% de **25-sa** et 1,5 mol% β -Lg est utilisée et donne une conversion 82 % après 48 h et un rapport énantiomérique e.r. est égal à 75 :25. Au vu de ce bon résultat, on s'est intéressé à connaître l'influence de la diminution de la concentration en catalyseur sur la vitesse et la sélectivité de la réaction. Lorsque la concentration de **25-pa** est divisée par 10 (en présence de 0,2 mol% β -Lg, entrée 3 et 6 du Tableau 7), la réaction atteint 64 % de conversion qu'au bout de 96 h, néanmoins l'énantiosélectivité au bout de 48 h ou 96 h est identique, mais se trouve être plus faible qu'avec une concentration de 1,5 mol% (entrée 3, 4 et 6 du Tableau 7).

Les différences de sélectivité entre les deux concentrations de complexe utilisées peuvent être expliquées par une différence de taux d'occupation de la protéine. En effet, en divisant la concentration de complexe par 10 ($[\text{25-pa}] = 2,5 \mu\text{M}$), on se rapproche de la valeur du K_d (1,52 μM) et donc la forme dissociée du complexe est favorisée. Pour connaître le taux

d'occupation de la protéine à ces deux différentes concentrations, l'équation suivante a été utilisée :

$$\text{Fraction occupée} = \frac{[\text{Ligand}^\circ\text{Recepteur}]}{[\text{Ligand}^\circ\text{Recepteur}] + [\text{Recepteur}]} = \frac{[\text{Ligand}]}{[\text{Ligand}] + Kd}$$

Après avoir effectué le calcul pour les deux concentrations, une diminution de 0,94 à 0,62 du taux d'occupation est observée entre les deux solutions. (Tableau 8). Le fait que l'on ait une moins bonne association du complexe avec la protéine à faible concentration peut alors expliquer la diminution de sélectivité en présence de 0,15 mol% **25-pa**. En effet, une plus grande partie des molécules de **25-pa** est sous forme libre et va réaliser la catalyse de la réaction en dehors de la protéine, moins la sélectivité sera bonne.

Tableau 8 : Taux d'occupation de la β -Lg par le complexe 25-pa

	[25-pa]_{totale}	Taux d'occupation
1,5 mol%	25 μ M	0,94
0,15 mol%	2,5 μ M	0,62

A 1,5 mol% de catalyseur et de β -Lg, le taux d'occupation est égal à 0,94, ce qui signifie que 6% du complexe est sous forme libre et capable de catalyser la réaction de manière racémique. Il est donc nécessaire d'ajouter un excès de protéine par rapport au complexe afin de favoriser le déplacement de l'équilibre en faveur de l'hybride β -Lg \subset **25-pa**. En effet, une dernière expérience menée avec 2 mol% de β -Lg et 1,5 mol% **25-pa** conduit à 67 % conversion et un er de 89 :11 après 48 h (Tableau 7 entrée 6).

Les conditions optimales retenues pour la suite ont donc été avec 1,5 mol% de catalyseur **25-pa** et 2,0 mol% de β -Lg pendant 48 h à 40°C.

Ensuite les hybrides β -Lg \subset **25-la**, **25-pa** et **25-sa** ont été engagés pour catalyser la réaction d'ATH sur des arylcétones ortho-substituées. Une bonne conversion est obtenue pour tous les substrats à l'exception de la 2-nitroacétophénone (entrées 4, 10 et 15 du Tableau 9) qui a une conversion moyenne de 18 à 49 % en raison de sa faible solubilité en milieu aqueux. Avec ces hybrides, on constate que l'on a une bonne sélectivité lorsque des groupements attracteurs et donneurs se trouvent en position ortho de l'arylcétone. Lorsque ces groupements sont remplacés par l'hydrogène (acétophénone), une perte totale de la sélectivité est observée

(entrées 6, 11 et 16 du Tableau 9). Il semble nécessaire d'avoir un substituant (électroattracteur ou donneur) sur la position ortho de l'aromatique, pour favoriser une bonne sélectivité. On constate aussi que le produit S est toujours obtenu majoritairement, il semble donc que l'approche de la cétone, ainsi que l'attaque se fait constamment du même côté.

Tableau 9 : ATH des orthoarylcétones avec β -Lg \subset 25-la, 25-p ou 25-sa

Entrée ^a	Complexe	Cétone	Conversion (%) ^b	e.r. ^b
				S : R
1	25-sa	2-methoxyacétophénone	88	94 : 06
2	25-sa	2-méthylacétophénone	99	68 : 32
3	25-sa	2-bromoacétophénone	69	64 : 36
4	25-sa	2-nitroacétophénone	49	82 : 18
5	25-sa	2-fluoroacétophénone	69	64 : 36
6	25-sa	Acétophénone	70	50 : 50
7	25-pa	2-methoxyacétophénone	67	89 : 11
8	25-pa	2-méthylacétophénone	99	64 : 36
9	25-pa	2-bromoacétophénone	83	68 : 32
10	25-pa	2-nitroacétophénone	18	86 : 14
11	25-pa	Acétophénone	60	50 : 50
12	25-la	2-methoxyacétophénone	94	88 : 12
13	25-la	2-méthylacétophénone	99	62 : 38
14	25-la	2-bromoacétophénone	82	74 : 26
15	25-la	2-nitroacétophénone	18	82 : 18
16	25-la	Acétophénone	68	50 : 50

^a la réaction est réalisée avec 1,5 mol% de catalyseur **25**, 2,0 mol% de β -Lg et 1,6 μ mol de cétone pendant 48 h à 40°C dans une solution de formate 1M.

^b Déterminé par GC, avec une Colonne: CP-Chirasil-DEX CB (25m x 0,25mm x 0,25µm), injector : 250°C, split ratio 20; FID detector: 250°C; carrier gas: N2, 1 mL/min.

b. Influence de la longueur de chaîne

En opposition avec les cétones substituées en 2, la 3-méthoxyacétophénone présente des sélectivités qui varient en fonction des différentes longueurs de chaîne des complexes **25-la**, **25-pa** et **25-sa** (Tableau 10). En effet avec l'hybride **25-la** qui a la longueur de chaîne la plus courte, on trouve une sélectivité de 11 :89 qui va diminuer avec l'augmentation du nombre de carbones sur la chaîne aliphatique. Ainsi avec l'hybride du complexe stéarique **25-sa** la sélectivité est nulle. Le rapport 53 :47 (entrée 1, Tableau 10) rentre dans le pourcentage d'erreur possible lors de l'intégration et est considérée comme une perte de la selectivité et non une inversion.

Tableau 10 : ATH de la 3-méthoxyacétophénone en présence de β -Lg c 25-la, 25-pa ou 25-sa.

Entrée ^a	Complexe	Conversion ^b	e.r. ^b
			S : R
1	25-sa	70	47 : 53
2	25-pa	67	64 : 36
3	25-la	57	89 : 11

^a La réaction est réalisée avec 1,5 mol% de catalyseur **25**, 2,0 mol% de β -Lg et 1,6 µmol de cétone pendant 48 h à 40°C dans une solution de formate 1M.

^b Déterminé par GC, avec une Colonne: CP-Chirasil-DEX CB (25m x 0,25mm x 0,25µm), injector : 250°C, split ratio 20; FID detector: 250°C; carrier gas: N2, 1 mL/min.

Dans une publication de Loch et al.⁴² une étude RX d'insertion de l'acide palmitique, laurique et stéarique dans la β -Lg a été faite. Cela a permis de déterminer la position de ces acides gras une fois insérée dans la protéine. Il a été mis en évidence que la chaîne aliphatique de l'acide palmitique (C 16) atteint le fond de la cavité. La chaîne hydrocarbonée de l'acide palmitique adopte une géométrie étendue avec tous les liaisons dans une conformation *trans* approximative à l'exception de C5-C6. L'acide stéarique (C18) est lié à la lactoglobuline de la même manière que l'acide palmitique avec un groupe carboxyle situé à l'entrée du calice face au Glu62. La conformation de la chaîne aliphatique jusqu'à C16 est similaire à celle de

l'acide palmitique. La partie terminale de la chaîne est courbée au bas du calice en raison de la longueur limitée du site de liaison. Enfin, l'acide laurique (C12) est inséré plus profondément dans la cavité que les deux autres, en raison de la longueur plus courte.

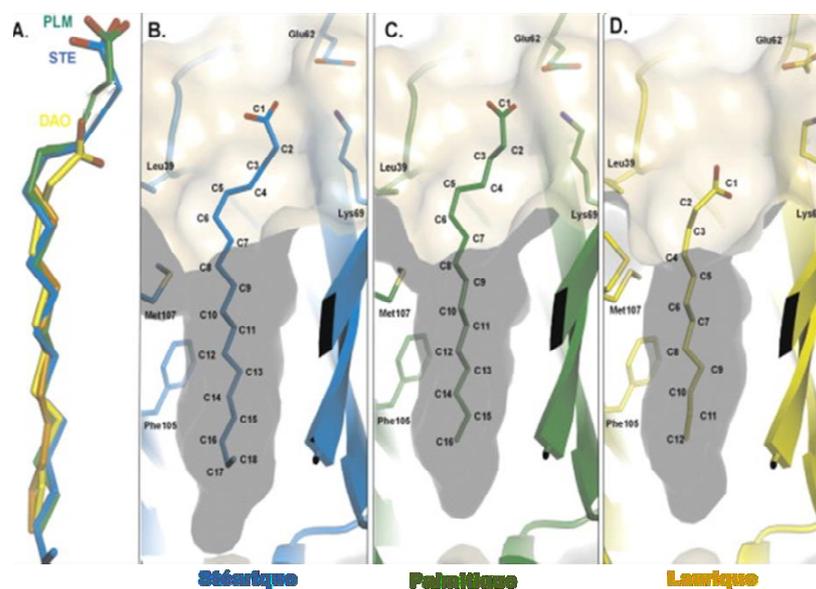


Figure 75 : Insertion de l'acide stéarique, palmitique et laurique dans la β -Lg⁴²

En se basant sur cette publication, on peut supposer que lorsque l'on a une chaîne laurique (C12) le complexe **25-la** va être inséré plus profondément dans la cavité, la seconde sphère de coordination a donc plus d'effet sur la sélectivité. A l'inverse, pour **25-sa** qui a une chaîne stéarique (C18), la tête du complexe est insérée moins profondément dans la cavité de la β -Lg, par conséquent l'influence de la protéine est moins prononcée.⁴²

c. Position du substituant sur l'acétophénone

Pour les complexes dérivés des acides stéariques, palmitiques, et laurique la présence d'un substituant méta sur l'acétophénone donne une moins bonne sélectivité que les positions para ou ortho. La différence de sélectivité ne peut pas être due uniquement à un problème d'encombrement sinon la position méta n'aurait pas été la seule touchée. Il semble possible que des effets électroniques en soient la raison. Dans le cas des méthoxyacétophénones, les positions ortho et para vont activer la réaction alors que dans le cas du méta c'est plutôt un effet désactivant qui apparaît. L'activation en position ortho et para semblent donc permettre

d'influencer de manière plus importante la sélectivité de la réaction que le groupement soit activant (OMe) ou désactivant (NO₂).

Tableau 11 : ATH des méthoxyacétophénones par les hybrides β -Lg \subset 25-sa ou 25-pa.

Entrée ^a	Complexe	Cétone	Conversion ^b	e.r. ^b
				S : R
1	25-sa	2-méthoxyacétophénone	88	94 : 06
2	25-sa	3-méthoxyacétophénone	70	47 : 53
3	25-sa	4-méthoxyacétophénone	85	94 : 06
4	25-pa	2-méthoxyacétophénone	67	89 : 11
5	25-pa	3-méthoxyacétophénone	67	64 : 36
6	25-pa	4-méthoxyacétophénone	85	97 : 03
7	25-la	2-méthoxyacétophénone	94	88 : 12
8	25-la	3-méthoxyacétophénone	57	89 : 11
9	25-la	4-méthoxyacétophénone	67	98 : 02

^a La réaction est réalisée avec 1,5 mol% de catalyseur **25**, 2,0 mol% de β -Lg et 1,6 μ mol de cétone pendant 48 h à 40°C dans une solution de formate 1M.

^b Déterminé par GC, avec une colonne: CP-Chirasil-DEX CB (25m x 0,25mm x 0,25 μ m), injecteur : 250°C, split ratio 20; détecteur FID: 250°C; gaz porteur: N₂, 1 mL/min.

d. Influence du ligand arène et du ligand chélatant

Lorsque les hybrides des complexes mesitylène **25-pb** et **25-lb** sont mis à réagir en présence de 2-méthoxyacétophénone, une baisse significative de la sélectivité est observée. Il semble que l'encombrement apporté par les méthyl de l'arène empêche d'avoir une bonne insertion du complexe dans la protéine. Ainsi la catalyse se produit avec un complexe moins bien ancré dans la cavité de la protéine, ce qui ne permet pas à la seconde sphère de coordination de venir influencer la sélectivité de la réaction.

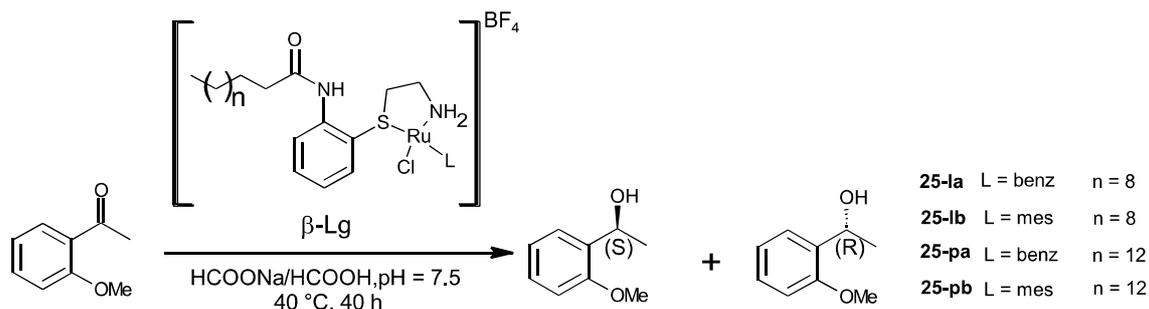


Schéma 46 : ATH de la 2-méthoxyacétophénone en présence des hybrides β -Lg \subset 25-1a, 25-pa, 25-1b ou 25-pb.

Tableau 12 : ATH de la 2-méthoxyacétophénone en présence des hybrides β -Lg \subset 25-pa, 25-pb, 25-1a et 25-1b.

Entrée ^a	Complexe	Conversion ^b	e.r. ^b
			S : R
1	25-pa	67	89 : 11
2	25-pb	70	58 : 42
3	25-1a	94	88 : 12
4	25-1b	60	50 : 50

^a La réaction est réalisée avec 1,5 mol% de catalyseur **25**, 2,0 mol% de β -Lg et 1,6 μ mol de cétone pendant 48 h à 40°C dans une solution de formate 1M.

^b Déterminé par GC, avec une colonne: CP-Chirasil-DEX CB (25m x 0,25mm x 0,25 μ m), injecteur : 250°C, split ratio 20; détecteur FID: 250°C; gaz porteur: N₂, 1 mL/min

e. Effet de l'oxydation du ligand soufré

L'utilisation de l'hybride sulfoxyde **27-pa** en association avec la β -Lg provoque une perte totale de la sélectivité de la réduction. Le fait d'avoir bloqué l'équilibration possible au niveau de la complexation de l'atome de soufre au ruthénium bloque in fine l'équilibre entre les diastéréoisomères. La protéine ne peut plus influencer la formation d'un stéréoisomère privilégié du complexe organométallique. En effet, lors de l'ajout de la protéine les hybrides formés seront incapables d'évoluer vers un hybride unique, seule la seconde sphère de coordination sera responsable de la sélectivité lors de la réduction. La réduction qui se passe dans la première sphère de coordination se fera donc dans un environnement achiral.

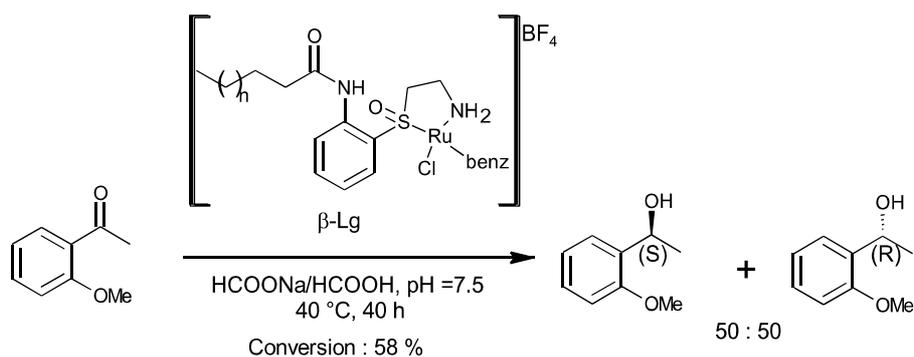


Schéma 47 : ATH de la 2-méthoxyacétophénone en présence de l'hybride β -LgC 27-pa.

Cela montre donc que dans le cas des complexes **25-la**, **25-pa** et **25-sa**, le système va bien s'adapter de manière à favoriser un unique énantiomère du complexe métallique permettant une bonne sélectivité lors du transfert d'hydrogène sur les substrats. De plus, on peut supposer que la sélectivité est apportée principalement par la 1^{ère} sphère de coordination mais induite par la 2^{ème} sphère de coordination de la protéine lors de l'ancrage supramoléculaire. Effectivement, lors de la formation de l'hybride **27-pa**, la perte de l'adaptabilité du système (et donc le transfert de la chiralité de la seconde sphère de coordination vers la première) provoque une perte totale de la sélectivité. La seconde sphère de coordination semble, dans ce cas, incapable d'induire seule le transfert de chiralité vers le produit. Il est nécessaire d'avoir un complexe possédant un ligand prochiral hémilabile pour parvenir à une réaction sélective.

En conclusion, seuls les hybrides des complexes **25-pa**, **25-la** et **25-sa** sont capables de catalyser la réaction d'ATH avec une bonne sélectivité car ces complexes ne sont pas trop encombrés pour s'insérer dans la protéine et seront capables de s'adapter une fois insérés dans la protéine.

VI. ATH de la trifluoroacétophénone.

Enfin la réduction de la trifluoroacétophénone a été réalisée avec les trois hybrides β -Lg C **25-la**, **25-pa** et **25-sa**, afin de pouvoir comparer leur pouvoir catalytique au complexe β -Lg C [ruthénium(pCymene)dipyridylamine] précédemment développé au laboratoire.

Tableau 13 : ATH de la trifluoroacétophénone en présence des hybrides β -Lg C25-la, 25-pa ou 25-sa.

Entrée ^a	Complexe	Conversion ^b	e.r. ^b
			S : R
1	25-sa	80	31 : 69
2	25-pa	85	37 : 63
3	25-la	80	30 : 70

^a La réaction est réalisée avec 1,5 mol% de catalyseur **25**, 2,0 mol% de β -Lg et 1,6 μ mol de cétone pendant 48 h à 40°C dans une solution de formate 1M.

^b Déterminé par GC, avec une colonne: CP-Chirasil-DEX CB (25m x 0,25mm x 0,25 μ m), injecteur : 250°C, split ratio 20; détecteur FID: 250°C; gaz porteur: N₂, 1 mL/min

Pour mémoire, le complexe de ruthénium p-cymène laurique (C12) avec un ligand chélatant dipyridylamine associé à la β -Lg utilisé précédemment donnait une conversion de seulement 17 % au bout de 72 h, avec un rapport S/R = 42 : 58.⁴³ En comparaison, les complexes **25-la**, **25-pa** et **25-sa** apportent tous une accélération de la réaction avec une conversion jusqu'à 85% au bout de 48 h et un er de 30 : 70 à 37 : 63. Ces complexes que nous avons préparés, ont donc permis d'améliorer à la fois la réactivité et la sélectivité de la réaction, en changeant la nature du ligand chélatant.

VII. ATH à différents pH

Les réductions par transfert d'hydrogène en milieu aqueux sont pH-dépendant et le pH affecte l'avancement de la réaction. Xiao et coll. ont montré que pour la réduction de cétones en tampon formiate, le pH optimal est aux environs de 7.⁴⁴ Ce pH correspond à la zone dans laquelle se fait l'insertion de nos complexes dans la β -Lg. Néanmoins nous savons que l'accessibilité à la poche hydrophobe de la protéine est pH-dépendant. Nous avons ainsi voulu voir l'influence du pH sur la réaction en acidifiant légèrement le milieu jusqu'à 6,5. Une perte totale de la sélectivité de la réduction de la 2-méthoxyacétophénone est observée. Ceci semble confirmer que l'on se trouve en dessous de la zone de fermeture de la boucle EF de la β -Lg, il est donc fort probable qu'une grande partie du complexe de ruthénium se trouve à l'extérieur de la protéine lors de la réduction, ce qui provoque cette perte de sélectivité. Néanmoins nous pouvons tirer une deuxième information importante avec cette expérience. En effet, cette

expérience montre aussi que le complexe **25-pa** a besoin de s'insérer dans le calice de la protéine pour induire une bonne sélectivité et qu'il ne s'associe pas à un autre site possible de la protéine ou s'il le fait cela n'induit aucune stéréosélectivité lors de la réduction

Tableau 14 : ATH de la 2-méthoxyacétophénone en fonction du pH en présence de l'hybride β -Lg \subset 25-pa

Entrée ^a	Complexe	pH	Conversion ^b	e.r. ^b
				S : R
1	25-pa	7,5	88	94 : 06
2	25-pa	6,5	80	50 : 50

^a La réaction est réalisée avec 1,5 mol% de catalyseur **25-pa**, 2,0 mol% de β -Lg et 1,6 μ mol de cétone pendant 48 h à 40°C dans une solution de formate 1M.

^b Déterminé par GC, avec une colonne: CP-Chirasil-DEX CB (25m x 0,25mm x 0,25 μ m), injecteur : 250°C, split ratio 20; détecteur FID: 250°C; gaz porteur: N₂, 1 mL/min

VIII. Mécanisme

Les mécanismes par lesquels l'hydrogène est transféré d'un donneur à un accepteur peuvent se faire de différentes manières selon le métal, le ligand et le donneur d'hydrogène utilisés (voir la Figure 76). Le «transfert direct d'hydrogène» se produit habituellement avec les métaux du groupe principal, tandis que les catalyseurs de métaux de transition suivent la voie dans laquelle une espèce de métal mono- ou dihydrure est impliquée. Le transfert de monohydrure peut se faire via une cétone coordonnée au métal, ou via un mécanisme de sphère externe. Enfin, lorsqu'aucune interaction substrat-métal n'est impliquée, le mécanisme peut être concerté ou par étapes.

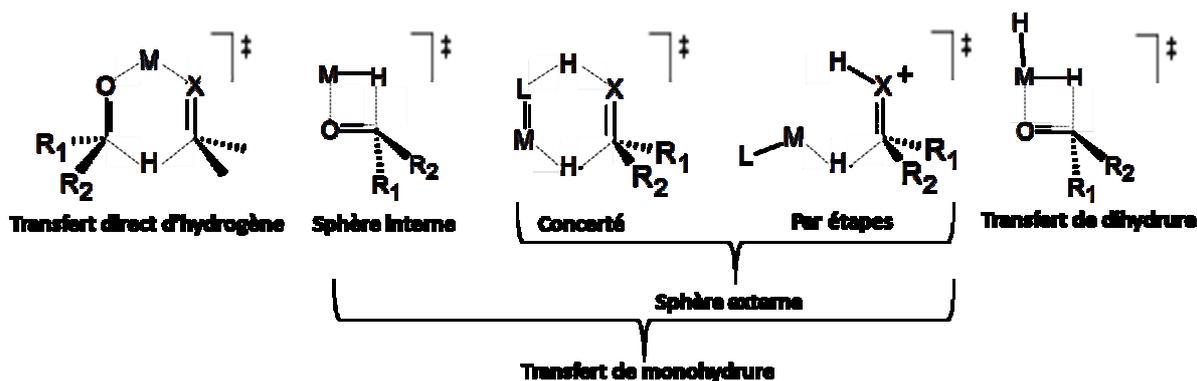


Figure 76 : Etats de transition envisagés pour le mécanisme d'hydrogénation par transfert sur les cétones.

Le mécanisme proposé par Xiao et coll.²¹ pour l'hydrogénation par transfert en milieux aqueux avec présence de formate et catalysée par les complexes Ru-, Rh ou Ir est représenté Figure 77. Celui, se déroule selon un mécanisme par sphère externe, de manière concerté (Figure 77) et s'appuie sur la coopération métal-ligand. Le métal et le ligand participent au processus de rupture et de formation du produit. L'état de transition n'implique pas une coordination directe du substrat avec le métal. Les ligands possédant des protons acides (c.-à-d. des amines primaires ou secondaires coordonnées au métal) facilitent l'attaque de l'hydruire sur le carbonyle comme le montre la Figure 77 présentant un des mécanisme de l'ATH envisagé dans l'eau en présence de formate. Cependant, de nouveaux mécanismes pour l'ATH ont été envisagé en fonction des influences électroniques et stériques du ligand, les catalyseurs subissent une activation CH par cyclometalation en roll-over et révèlent en outre que la formation d'une espèce hydrido au ruthénium (II) est plausible par l'élimination de l' β -hydruire à partir de l'isopropanol. Ce processus ouvre la voie vers l'hydrogénation par transfert catalytique de cétones avec de l'isopropanol comme source d'hydrogène dans des conditions sans base et douces.⁴⁵

L'hydrogénation par transfert asymétrique de cétones avec des complexes de Ru(II), Rh(III) et Ir(III) s'est révélée viable dans l'eau. En offrant des vitesses de réaction rapides, et non seulement le protocole est attractif pour l'environnement. L'eau joue un rôle clé dans les réactions aqueuses d'ATH. Elle accélère la réduction, stabilise le catalyseur, modifie l'état de transition du transfert d'hydrogène et facilite la séparation du catalyseur du produit.²¹

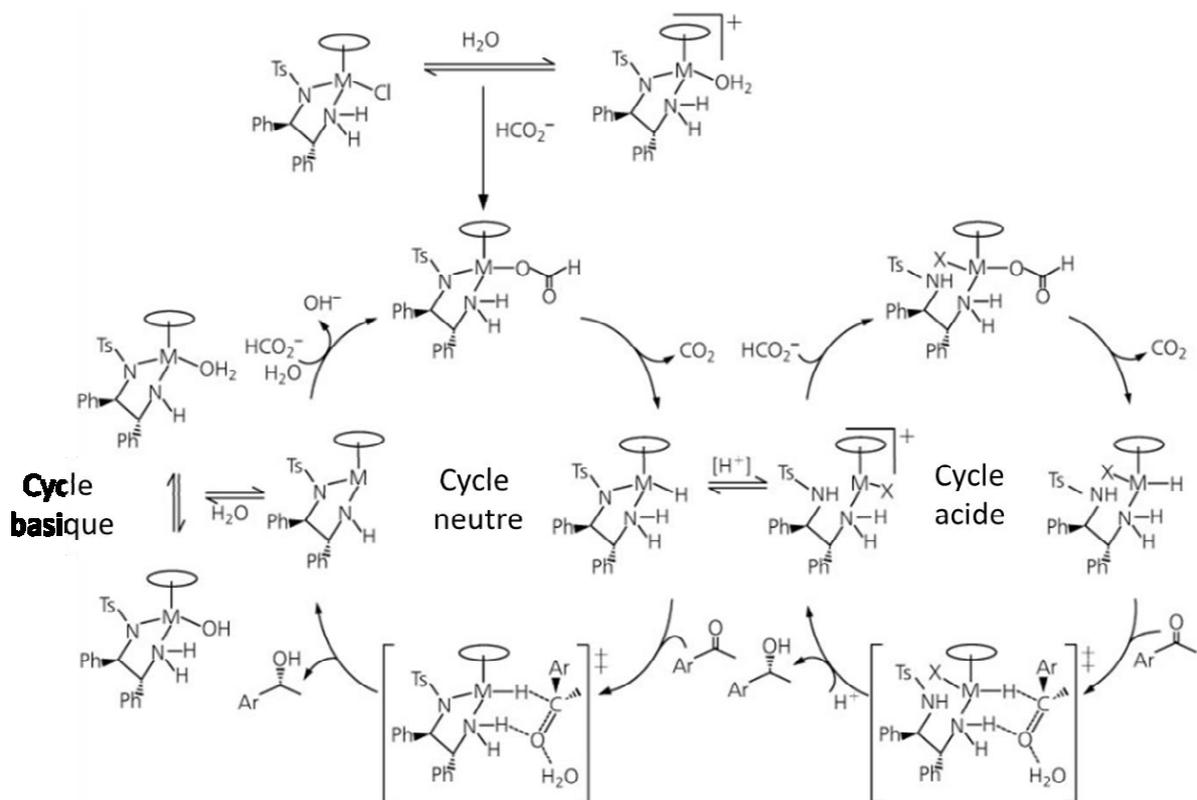


Figure 77 : Mécanisme proposé pour l'hydrogénation asymétrique par transfert dans l'eau.²¹

IX. Réduction d'imine

Des tests de réduction de la 3,4-dihydro-6,7-diméthoxy-1-méthylisoquinoline ont été entrepris avec les hybrides β -Lg \subset **25-la**, **25-pa** et **25-sa**. Cependant, à pH = 7,5 et une solution de formiate à 1 M, aucune réduction du composé n'est observée (Tableau 15). Le problème principal pour réaliser ces réductions, est la zone de pH dans laquelle nous nous trouvons qui n'est pas optimale pour permettre la réduction d'imine. En effet, les réductions par transfert d'hydrogène en milieux aqueux sont pH-dépendantes. Lors d'études récentes sur l'hydrogénation asymétrique d'imines, il a été suggéré que la quinoline est hydrogénée par un mécanisme ionique sous sa forme protonée (

Figure 78).^{46, 47} Un mécanisme d'hydrogénation ionique⁴⁸ de ce type a également été trouvé dans des études récentes sur l'hydrogénation asymétrique d'imines.⁴⁹ En regardant le mécanisme de la réaction de plus près, l'imine doit être protonée, or son pK_a étant de 5,4, l'équipe de Xiao a montré que le pH optimal de ces réactions était de 5.⁵⁰ En effet, il permet la

protonation de l'imine mais il nécessite aussi un pH suffisamment élevé pour avoir une concentration en formiate raisonnable. Dans notre cas, l'utilisation de la β -Lg comme protéine hôte pour la réduction d'imine devient problématique puisque la boucle EF se referme aux alentours de pH 6,5. Il n'est donc pas possible de réduire le pH à 5 pour favoriser la réduction asymétrique. Afin de réaliser cette réaction, le pH a été baissé jusqu'à 6,5, malheureusement, aucune réaction n'est observée dans ces conditions.

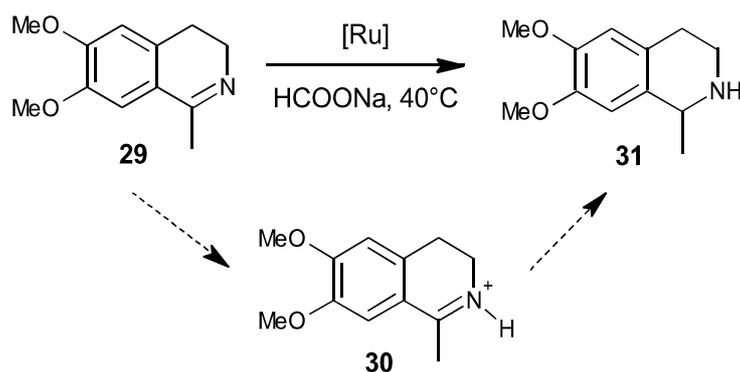


Figure 78 : Intermédiaire possible de la quinoline pour l'ATH en milieu aqueux

Tableau 15 : ATH de la 3,4-dihydro-6,7-diméthoxy-1-méthylisoquinoline par les hybrides β -Lg \subset 25-la, 25-sa ou 25-pa à différents pH.

Entrée ^a	Complexe	pH	Imine	Conversion ^b
1	25-sa	7,5	29	0
2	25-pa	7,5	29	0
3	25-la	7,5	29	0
4	25-pa	6,5	29	0

^aLa réaction est réalisée avec 1,5 mol% de catalyseur **25**, 2,0 mol% de β -Lg et 1,6 μ mol de cétone pendant 48 h à 40°C dans une solution de formate 1M.

^bDéterminé par HPLC sur Kromasil 5-cellucoat, avec hexane/isopropanol 96/4 pendant 15 min à 1 mL/min.

Pour pouvoir rester dans un pH aux alentours de 7,5 la concentration en formiate a été augmentée espérant ainsi forcer la réaction. On constate qu'avec une concentration de 3 M, on arrive à réaliser la réaction ATH. Cependant les conversions restent assez faibles et aucune énantiosélectivité n'est obtenue. De plus, une trop forte concentration en formiate provoque

une dénaturation de la protéine au cours du temps, ce qui peut expliquer le fait que l'on n'ait aucune sélectivité.

Tableau 16 : ATH d'imine en présence des hybrides β -Lg \subset 25-la, 25-pa ou 25-sa à différentes concentrations de formiate à pH 7,5.

Entrée ^a	Complexe	Tampon	Imine	Conversion ^b	Ratio ^b
1	25-pa	HCOONa 1M	29	0	-
2	25-pa	HCOONa 2M	29	0	-
3	25-pa	HCOONa 3M	29	20	45 : 55
4	25-la	HCOONa 3M	29	15	47 : 53
5	25-sa	HCOONa 3M	29	21	48 : 52

^aLa réaction est réalisée avec 1,5 mol% de catalyseur **25**, 2,0 mol% de β -Lg et 1,6 μ mol de cétone pendant 48 h à 40°C dans une solution de formate 1M.

^bDéterminée par HPLC sur Kromasil 5-cellucoat, avec hexane/isopropanol 96/4 pendant 15 min à 1 mL/min.

Il est donc possible de réaliser la réduction d'imine en forçant la protonation en augmentant de manière importante la concentration en formiate. Néanmoins cette augmentation ne peut dépasser 3 M, pour éviter la destruction du système et les conversions obtenues restent malgré tout assez modestes.

X. Conclusion

En conclusion, de nouveaux complexes semi-sandwich de ruthénium à ligands N, S capables de s'insérer dans la β -Lg ont été synthétisés. Ces métalloenzymes artificielles ont montré une activité en hydrogénation asymétrique par transfert d'arylcétones et des rapports énantiomériques meilleurs que ceux obtenus précédemment avec des complexes achiraux de ruthénium insérés dans la β -Lg. Les complexes aux complexes **25-la**, **25-pa** et **25-sa** permettent l'ATH d'un plus grand nombre de substrats qui sont réduits de manière efficace. Concernant la trifluoroacétophénone qui était le seul substrat à être réduit avec les complexes dipyridylamine, on observe qu'avec les hybrides des complexes **25-la**, **25-pa** et **25-sa**, une conversion supérieure en alcool est atteinte en un temps plus court et que le rapport énantiomérique est meilleur (S/R = 30/70 contre 42/58).

Dans le cas des hybrides des complexes **25-la**, **25-pa** et **25-sa**, il semble possible que l'insertion des différents stéréoisomères puisse être influencée par la seconde sphère de coordination de la protéine et par conséquent favoriser un déplacement de l'équilibre entre ceux-ci de manière à former un hybride unique une fois inséré dans la protéine. Cette idée est confirmée grâce à la comparaison avec le complexe **27-pa** mais aussi grâce à la très bonne sélectivité obtenue avec ces complexes sur certains substrats (jusqu'à un rapport énantiomérique R/S = 2/98 pour la 4-méthoxyacétophénone avec l'hybride de **25-la**).

Même si cette adaptation des complexes vis-à-vis de la protéine peut expliquer la bonne sélectivité, il semble que des effets électroniques supplémentaires apportés par la seconde sphère de coordination interviennent, provoquant la différence de sélectivité entre les substrats.

Une meilleure association du complexe en rajoutant des liaisons hydrogènes pourrait aussi être envisagée. Pour cela, la fonctionnalisation du groupement amine du ligand **24** pourrait être faite avec des composés comme le 1-bromoéthanol, ce qui permettrait l'entrée d'un groupement hydroxy capable de réaliser des liaisons hydrogènes supplémentaires avec la protéine, ainsi une nouvelle étude de la sélectivité de ces nouveaux complexes pourrait être menée (Figure 79).

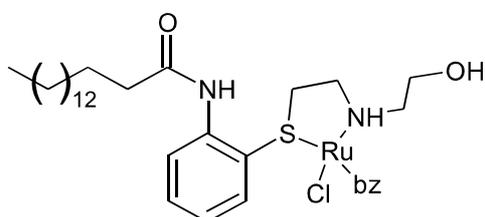


Figure 79: complexe de ruthénium pouvant réaliser des liaisons hydrogènes supplémentaire.

Afin de continuer ces travaux, d'autres métaux tels que le rhodium ou l'iridium pourraient être utilisés à partir des ligands **24-l**, **24-p** et **24-s**, afin de pouvoir comparer l'efficacité des différents métaux entre eux mais aussi permettre la réduction d'autres types de cétones voire d'imines et potentiellement une nouvelle sélectivité. Enfin pour la réduction d'imine, l'utilisation de la β -Lg possédant une mutation de l'acide aminé Glu 89 responsable de la mobilité de la boucle EF en fonction du pH pourrait être intéressante afin de suivre l'influence de la seconde sphère de coordination de la protéine et réaliser des réactions à un pH plus acide.

XI. Bibliographie

- (1) Fischer, E. O.; Böttcher, R. Über Aromatenkomplexe von Metallen. Ein Komplex Des Ruthenium(II) Mit Mesitylen. *Z. Für Anorg. Allg. Chem.* **1957**, *291* (5–6), 305–309.
- (2) Winkhaus, G.; Singer, H. Ruthen(II)-Komplexe Mit Zweizähigem Cycloheptatrien Und Benzol. *J. Organomet. Chem.* **1967**, *7* (3), 487–491.
- (3) Bennett, M. A.; Smith, A. K. Arene ruthenium(II) Complexes Formed by Dehydrogenation of Cyclohexadienes with ruthenium(III) Trichloride. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1974**, *0* (2), 233–241.
- (4) Wang, D.; Astruc, D. The Golden Age of Transfer Hydrogenation. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (13), 6621–6686.
- (5) Opstal, T.; Couchez, K.; Verpoort, F. Easily Accessible Ring Opening Metathesis and Atom Transfer Radical Polymerization Catalysts Based on Arene, Norbornadiene and Cyclooctadiene Ruthenium Complexes Bearing Schiff Base Ligands. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345* (3), 393–401.
- (6) Brunner, H.; Zwack, T.; Zabel, M.; Beck, W.; Böhm, A. Optically Active Transition Metal Complexes. 130.1 Synthesis, Crystal Structures, and Catalytic Properties of Chiral-at-Metal (η^6 -Arene)ruthenium(II) and (η^6 -Arene)osmium(II) Half-Sandwich Complexes. Crystallization of Pure Diastereomers versus Diastereomer Mixtures in a 1:1 Ratio. *Organometallics* **2003**, *22* (8), 1741–1750.
- (7) Noyori, R.; Hashiguchi, S. Asymmetric Transfer Hydrogenation Catalyzed by Chiral Ruthenium Complexes. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30* (2), 97–102.
- (8) Zhang, Z.; Butt, N. A.; Zhang, W. Asymmetric Hydrogenation of Nonaromatic Cyclic Substrates. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (23), 14769–14827.
- (9) Robertson, A.; Matsumoto, T.; Ogo, S. The Development of Aqueous Transfer Hydrogenation Catalysts. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (40), 10304–10310.
- (10) Wetzel, A.; Wöckel, S.; Schelwies, M.; Brinks, M. K.; Rominger, F.; Hofmann, P.; Limbach, M. Selective Alkylation of Amines with Alcohols by Cp*–Iridium(III) Half-Sandwich Complexes. *Org. Lett.* **2013**, *15* (2), 266–269.
- (11) Suzuki, T.; Matsuo, T.; Watanabe, K.; Katoh, T. Iridium-Catalyzed Oxidative Dimerization of Primary Alcohols to Esters Using 2-Butanone as an Oxidant. *Synlett* **2005**, *2005* (09), 1453–1455.
- (12) Fujita, K.; Yoshida, T.; Imori, Y.; Yamaguchi, R. Dehydrogenative Oxidation of Primary and Secondary Alcohols Catalyzed by a Cp*Ir Complex Having a Functional C,N-Chelate Ligand. *Org. Lett.* **2011**, *13* (9), 2278–2281.
- (13) Noyori, R.; Ohkuma, T. Asymmetric Catalysis by Architectural and Functional Molecular Engineering: Practical Chemo- and Stereoselective Hydrogenation of Ketones. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2001**, *40* (1), 40–73.
- (14) Nakano, Y.; Sakaguchi, S.; Ishii, Y. Meerwein–Ponndorf–Verley-Type Reductive Acetylation of Carbonyl Compounds to Acetates by Lanthanide Complexes in the Presence of Isopropenyl Acetate. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (10), 1565–1569.
- (15) Parekh, V.; Ramsden, J. A.; Wills, M. Ether-Tethered Ru(II)/TsDPEN Complexes: Synthesis and Applications to Asymmetric Transfer Hydrogenation. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *Vol.2* (No.2), 406–414.
- (16) Ikariya, T.; Murata, K.; Noyori, R. Bifunctional Transition Metal-Based Molecular Catalysts for Asymmetric Syntheses. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (3), 393–406.
- (17) Choi, J.; MacArthur, A. H. R.; Brookhart, M.; Goldman, A. S. Dehydrogenation and Related Reactions Catalyzed by Iridium Pincer Complexes. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (3), 1761–1779.

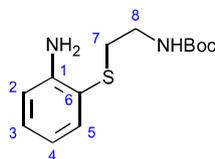
- (18) Crabtree, R. H. Homogeneous Transition Metal Catalysis of Acceptorless Dehydrogenative Alcohol Oxidation: Applications in Hydrogen Storage and to Heterocycle Synthesis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (13), 9228–9246.
- (19) Hashiguchi, S.; Fujii, A.; Takehara, J.; Ikariya, T.; Noyori, R. Asymmetric Transfer Hydrogenation of Aromatic Ketones Catalyzed by Chiral Ruthenium(II) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (28), 7562–7563.
- (20) Fujii, A.; Hashiguchi, S.; Uematsu, N.; Ikariya, T.; Noyori, R. Ruthenium(II)-Catalyzed Asymmetric Transfer Hydrogenation of Ketones Using a Formic Acid–Triethylamine Mixture. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (10), 2521–2522.
- (21) Wu, B. X.; Wang, C.; Xiao, J. Asymmetric Transfer Hydrogenation in Water with Platinum Group Metal Catalysts. *Platin. Met. Rev.* **2010**, *54* (1), 3–19.
- (22) Gladiali, S.; Alberico, E. Asymmetric Transfer Hydrogenation: Chiral Ligands and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (3), 226–236.
- (23) Wu, X.; Xiao, J. Aqueous-Phase Asymmetric Transfer Hydrogenation of Ketones – a Greener Approach to Chiral Alcohols. *Chem. Commun.* **2007**, *0* (24), 2449–2466.
- (24) Bubert, C.; Blacker, J.; Brown, S. M.; Crosby, J.; Fitzjohn, S.; Muxworthy, J. P.; Thorpe, T.; Williams, J. M. J. Synthesis of Water-Soluble Aminosulfonamide Ligands and Their Application in Enantioselective Transfer Hydrogenation. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (24), 4037–4039.
- (25) Ogo, S.; Abura, T.; Watanabe, Y. pH-Dependent Transfer Hydrogenation of Ketones with HCOONa as a Hydrogen Donor Promoted by (η^6 -C₆Me₆)Ru Complexes. *Organometallics* **2002**, *21* (14), 2964–2969.
- (26) Configurational Flexibility of Epimeric β -Aminothioether-chelated Ruthenium(II) η^6 -Arene Complex Salts: Zeitschrift für Naturforschung B <https://www.degruyter.com/view/j/znb.2009.64.issue-1/znb-2009-0117/znb-2009-0117.xml> (accessed Jul 26, 2017).
- (27) Hamaker, C. G.; Halbach, D. P. Synthesis, Structure, and Characterization of Some Ruthenium Arene Complexes of N-(Arylmethylene)-2-(Methylthio)anilines and 2-(Methylthio)aniline. *Inorganica Chim. Acta* **2006**, *359* (3), 846–852.
- (28) Prakash, O.; Joshi, H.; Sharma, K. N.; Gupta, P. L.; Singh, A. K. Transfer Hydrogenation (pH Independent) of Ketones and Aldehydes in Water with Glycerol: Ru, Rh, and Ir Catalysts with a COOH Group near the Metal on a (Phenylthio)methyl-2-Pyridine Scaffold. *Organometallics* **2014**, *33* (14), 3804–3812.
- (29) Carmona, M.; Rodríguez, R.; Lahoz, F. J.; García-Orduña, P.; Cativiela, C.; López, J. A.; Carmona, D. Half-Sandwich Complexes of Iridium and Ruthenium Containing Cysteine-Derived Ligands. *Dalton Trans.* **2017**, *46* (3), 962–976.
- (30) Klein, G.; Humbert, N.; Gradinaru, J.; Ivanova, A.; Gilardoni, F.; Rusbandi, U. E.; Ward, T. R. Tailoring the Active Site of Chemzymes by Using a Chemogenetic-Optimization Procedure: Towards Substrate-Specific Artificial Hydrogenases Based on the Biotin–Avidin Technology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (47), 7764–7767.
- (31) Dürrenberger, M.; Heinisch, T.; Wilson, Y. M.; Rossel, T.; Nogueira, E.; Knörr, L.; Mutschler, A.; Kersten, K.; Zimbron, M. J.; Pierron, J.; Schirmer, T.; Ward, T. R. Artificial Transfer Hydrogenases for the Enantioselective Reduction of Cyclic Imines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (13), 3026–3029.
- (32) Letondor, C.; Pordea, A.; Humbert, N.; Ivanova, A.; Mazurek, S.; Novic, M.; Ward, T. R. Artificial Transfer Hydrogenases Based on the Biotin–(Strept)avidin Technology: Fine Tuning the Selectivity by Saturation Mutagenesis of the Host Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (25), 8320–8328.

- (33) Creus, M.; Pordea, A.; Rossel, T.; Sardo, A.; Letondor, C.; Ivanova, A.; LeTrong, I.; Stenkamp, R. E.; Ward, T. R. X-Ray Structure and Designed Evolution of an Artificial Transfer Hydrogenase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (8), 1400–1404.
- (34) Zimbron, J. M.; Heinisch, T.; Schmid, M.; Hamels, D.; Nogueira, E. S.; Schirmer, T.; Ward, T. R. A Dual Anchoring Strategy for the Localization and Activation of Artificial Metalloenzymes Based on the Biotin–Streptavidin Technology. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (14), 5384–5388.
- (35) Heinisch, T.; Langowska, K.; Tanner, P.; Reymond, J.-L.; Meier, W.; Palivan, C.; Ward, T. R. Fluorescence-Based Assay for the Optimization of the Activity of Artificial Transfer Hydrogenase within a Biocompatible Compartment. *ChemCatChem* **2013**, *5* (3), 720–723.
- (36) W. Monnard, F.; S. Nogueira, E.; Heinisch, T.; Schirmer, T.; R. Ward, T. Human Carbonic Anhydrase II as Host Protein for the Creation of Artificial Metalloenzymes: The Asymmetric Transfer Hydrogenation of Imines. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (8), 3269–3274.
- (37) Chevalley, A.; Salmain, M. Enantioselective Transfer Hydrogenation of Ketone Catalysed by Artificial Metalloenzymes Derived from Bovine β -Lactoglobulin. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (98), 11984–11986.
- (38) Otto, M.; Parr, J.; Slawin, A. M. Z. Diastereoselective Preparation of Chiral-at-Metal Organometallic Complexes Using a Chelating Sulfoxide–Carboxylate Ligand. *Organometallics* **1998**, *17* (21), 4527–4529.
- (39) Yao, S.-Y.; Chen, X.-Y.; Ou, Y.-L.; Ye, B.-H. Chiral Recognition and Dynamic Thermodynamic Resolution of Sulfoxides by Chiral Iridium(III) Complexes. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (2), 878–885.
- (40) Cogan, U.; Kopelman, M.; Mokady, S.; Shinitzky, M. Binding Affinities of Retinol and Related Compounds to Retinol Binding Proteins. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *65* (1), 71–78.
- (41) Frapin, D.; Dufour, E.; Haertle, T. Probing the Fatty Acid Binding Site of Beta-Lactoglobulins. *J. Protein Chem.* **1993**, *12* (4), 443–449.
- (42) Loch, J. I.; Polit, A.; Bonarek, P.; Olszewska, D.; Kurpiewska, K.; Dziejzicka-Wasylewska, M.; Lewiński, K. Structural and Thermodynamic Studies of Binding Saturated Fatty Acids to Bovine β -Lactoglobulin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50* (4), 1095–1102.
- (43) Chevalley, A.; Cherrier, M. V.; Fontecilla-Camps, J. C.; Ghasemi, M.; Salmain, M. Artificial Metalloenzymes Derived from Bovine β -Lactoglobulin for the Asymmetric Transfer Hydrogenation of an Aryl Ketone--Synthesis, Characterization and Catalytic Activity. *Dalton Trans. Camb. Engl.* **2003** **2014**, *43* (14), 5482–5489.
- (44) Wu, X.; Li, X.; Zanotti-Gerosa, A.; Pettman, A.; Liu, J.; Mills, A. J.; Xiao, J. RhIII- and IrIII-Catalyzed Asymmetric Transfer Hydrogenation of Ketones in Water. *Chem. – Eur. J.* **2008**, *14* (7), 2209–2222.
- (45) Kerner, C.; Lang, J.; Gaffga, M.; Menges, F. S.; Sun, Y.; Niedner-Schatteburg, G.; Thiel, W. R. Mechanistic Studies on Ruthenium(II)-Catalyzed Base-Free Transfer Hydrogenation Triggered by Roll-Over Cyclometalation. *ChemPlusChem* **2017**, *82* (2), 212–224.
- (46) Zhou, H.; Li, Z.; Wang, Z.; Wang, T.; Xu, L.; He, Y.; Fan, Q.-H.; Pan, J.; Gu, L.; Chan, A. S. C. Hydrogenation of Quinolines Using a Recyclable Phosphine-Free Chiral Cationic Ruthenium Catalyst: Enhancement of Catalyst Stability and Selectivity in an Ionic Liquid. *Angew. Chem.* **2008**, *120* (44), 8592–8595.
- (47) Rueping, M.; Antonchick, A. P.; Theissmann, T. Eine hoch enantioselective Brønsted-Säure-katalysierte Kaskadenreaktion: organokatalytische Transferhydrierung von

- Chinolinen und deren Anwendung in der Synthese von Alkaloiden. *Angew. Chem.* **2006**, *118* (22), 3765–3768.
- (48) Guan, H.; Imura, M.; Magee, M. P.; Norton, J. R.; Zhu, G. Ruthenium-Catalyzed Ionic Hydrogenation of Iminium Cations. Scope and Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (21), 7805–7814.
- (49) Li, C.; Wang, C.; Villa-Marcos, B.; Xiao, J. Chiral Counteranion-Aided Asymmetric Hydrogenation of Acyclic Imines. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (44), 14450–14451.
- (50) Wang, C.; Li, C.; Wu, X.; Pettman, A.; Xiao, J. pH-Regulated Asymmetric Transfer Hydrogenation of Quinolines in Water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (35), 6524–6528.

XII. Methods

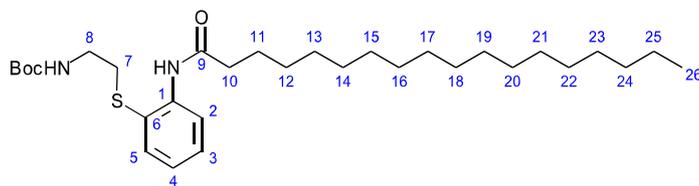
1. Synthesis of tert-butyl (2-((2-aminophenyl)thio)ethyl)carbamate **22**



Potassium tert-butyrate (739 mg, 6.6 mmol) was added to the solution of 2-aminothiophenol (0.75 g, 0.64 mL, 6 mmol) in EtOH (20 mL) at 0°C. The resulting mixture was stirred for 30 min at 0°C, then a solution of N-Boc-2-bromoethylamine (1.34 g, 6 mmol) in EtOH (5 mL) was added. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 1 h, then solvent was evaporated. Residue was dissolved in DCM (20 mL) and solution was filtered. After evaporation the residue was purified by chromatography (SiO₂, PE/AcOEt = 8/2). Yield: 708 mg (44%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.42 (s, 9H, H_{Boc}), 2.83 (t, *J* = 6 Hz, 2H, H₇), 3.22 (m, 2H, H₈), 5.04 (s, 1H, NH), 6.70 (m, 2H, H_{3,4}), 7.14 (m, 1H, H₅), 7.38 (dd, *J* = 7, 1 Hz, 1H, H₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 28.0 (C_{Boc}), 34.8 (C₇), 39.6 (C₈), 79.50 (C_{Boc}), 114.8 (C₄), 116.4 (C₃), 118.5 (C₂), 129.8 (C₅), 136.0 (C₁), 148.1 (C₆), 155.4 (CO_{Boc}). IR (ν, cm⁻¹) : 3347 (ν_{N-H}), 2951 (ν_{C-H}), 1702 (ν_{C=O}), 1676 (ν_{C=O}), 1522 (ν_{N-H}), 1575 (ν_{C=C}), 1284 (ν_{C-N}), 1167 (ν_{C-O}). ESI-HRMS (*m/z*) : found : 291.1230 (M+Na⁺) (calc for C₁₃H₂₀N₂O₂SNa : 291.1235).

2. Synthesis of tert-butyl (2-((2-stearamidophenyl)thio)ethyl)carbamate **23-s**

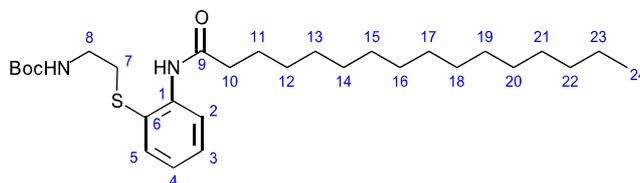


Procedure A : Stearoyl chloride (742 mg, 0.83 mL, 2.45 mmol) was added to a solution of tert-butyl (2-((2-aminophenyl)thio)ethyl)carbamate **22** (546 mg, 2.04 mmol) in AcOEt /

saturated NaHCO₃ (aq) (30 mL, 2/1) and the resulting mixture was stirred for 4 h at room temperature. Then, mixture was diluted with DCM (50 mL), the organic phase was separated, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated. Residue was purified by chromatography (SiO₂, PE/AcOEt = 8/2). Yield: 897 mg (82%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, *J* = 6 Hz, 3H, H₂₆), 1.27 (s, 28H, 1H, H₁₂₋₂₅), 1.44 (s, 9H, H_{Boc}), 1.75 (q, *J* = 13, 7 Hz, 2H, H₁₁), 2.44 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H₁₀), 2.86 (t, *J* = 6 Hz, 2H, H₇), 3.24 (dd, *J* = 13, 6 Hz, 2H, H₈), 7.04 (t, *J* = 7 Hz, 1H, H₄), 7.33 (m, 1H, H₃), 7.51 (dd, *J* = 8, 1 Hz, 1H, H₅), 8.39 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H₂), 8.49 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.1 (C₂₆), 22.7 (C₂₅), 25.6 (C₂₄), 28.3 (C_{Boc}), 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.9, 31.1 (C₁₁₋₂₃), 36.2 (C₁₀), 38.1 (C₇), 40.1 (C₈), 79.6 (C_{Boc}), 120.8 (C₄), 124.1 (C₃), 130.0 (C₂), 135.3 (C₅), 139.4 (C₁), 141.9 (C₆), 156.2 (CO_{Boc}), 171.7 (CO). IR (ν, cm⁻¹) : 2951 (ν_{CH}), 1702 (ν_{C=O}), 1676 (ν_{C=O}), 1522 (ν_{N-H}), 1575 (ν_{C=C}), 1284 (ν_{C-N}), 1167 (ν_{C-O}). ESI-HRMS (m/z) : found : 557.2361 (M+Na⁺) (calc for C₃₁H₅₄N₂O₃SNa : 557.2365).

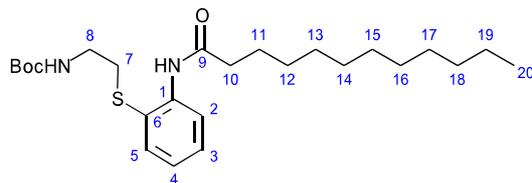
3. Synthesis of tert-butyl (2-((2-palimidophenyl)thio)ethyl)carbamate 23-p



Following procedure A : Compound **23-p** was prepared from palmitoyl chloride (657 mg, 2.40 mmol), and tert-butyl (2-((2-aminophenyl)thio)ethyl)carbamate **22** (535 mg, 2.00 mmol). Yield: 688 mg (68%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.90 (t, *J* = 6 Hz, 3 H, H₂₄), 1.28 (m, 28 H, H₁₂₋₂₃), 1.45 (s, 9 H, H_{Boc}), 1.76 (q, *J* = 7 Hz, 2 H, H₁₁), 2.46 (t, *J* = 7 Hz, 2 H, H₁₀), 2.88 (t, *J* = 6 Hz, 2 H, H₇), 3.26 (s, 2 H, H₈), 7.06 (t, *J* = 7 Hz, 1 H, H₄), 7.34 (t, *J* = 8 Hz, 1 H, H₃), 7.53 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H₅), 8.40 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H₂), 8.51 (s, 1 H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.1 (C₂₄), 22.7 (C₂₃), 25.6 (C₂₂), 28.4 (C_{Boc}), 29.7, 29.9, 31.9, 34.4 (C₁₁₋₂₁), 35.6 (C₁₀), 38.0 (C₇), 39.9 (C₈), 79.8 (C_{Boc}), 120.8 (C₄), 124.1 (C₃), 129.9 (C₂), 135.2 (C₅), 138.4 (C₁), 140.4 (C₆), 156.5 (CO_{Boc}), 171.6 (CO). IR (ν, cm⁻¹) : 2919 (ν_{C-H}), 1702 (ν_{C=O}), 1679 (ν_{C=O}), 1570 (ν_{N-H}), 1519 (ν_{C=C}), 1284 (ν_{C-N}), 1167 (ν_{C-O}). ESI-HRMS (m/z) : found: 529.7731 (M+Na⁺) (calc for C₂₉H₅₀N₂O₃SNa : 529.7721).

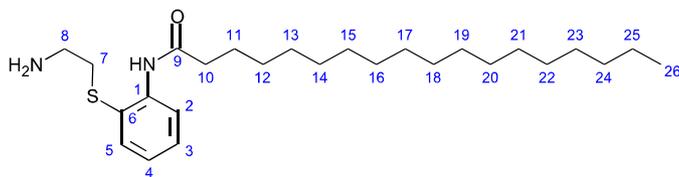
4. Synthesis of tert-butyl (2-((2-lauridophenyl)thio)ethyl)carbamate **23-I**



Following procedure A : Compound **23-I** was prepared from lauroyl chloride (523 mg, 2.40 mmol), and tert-butyl (2-((2-aminophenyl)thio)ethyl)carbamate **22** (535 mg, 2.00 mmol). Yield: 630 mg (70%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.51 (s, 1 H, NH), 8.39 (d, $J = 7$ Hz, 1 H, H_2), 7.51 (m, 1 H, H_5), 7.33 (m, 1 H, H_3), 7.05 (t, $J = 7$ Hz, 1 H, H_4), 3.24 (s, 2 H, H_8), 2.87 (m, 2 H, H_7), 2.44 (t, $J = 7$ Hz, 2 H, H_{10}), 1.77 (m, 2 H, H_{11}), 1.44 (m, 9 H, H_{Boc}), 1.26 (s, 16 H, H_{12-19}), 0.89 (t, $J = 7$ Hz, 3H, H_{20}). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 171.7 (CO), 156.0 (CO_{Boc}), 139.7 (C_6), 137.4 (C_1), 135.5 (C_5), 130.2 (C_2), 124.5 (C_3), 120.9 (C_4), 79.7 (C_{Boc}), 40.7 (C_8), 38.3 (C_7), 36.5 (C_{10}), 30.0, 29.6, 29.5, 29.4 (C_{11-17}), 28.6 (C_{Boc}), 25.9 (C_{18}), 23.0 (C_{19}), 14.4 (C_{20}). IR (ν , cm^{-1}): 2919 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1707 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1681 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1576 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1520 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1287 ($\nu_{\text{C-N}}$), 1170 ($\nu_{\text{C-O}}$). ESI-HRMS (m/z) : found : 473.6668 ($\text{M}+\text{Na}^+$) (calc for $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_3\text{SNa}$: 473.6669).

5. Synthesis of N-(2-((2-aminoethyl)thio)phenyl)stearamide **24-s**

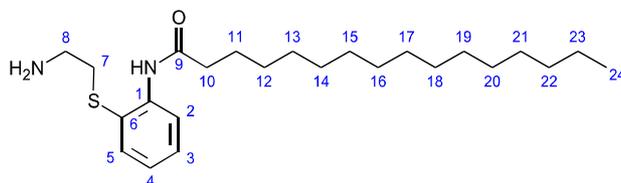


General procedure B : tert-Butyl (2-((2-stearamidophenyl)thio)ethyl)carbamate **23-s** (897 mg, 1.68 mmol) was dissolved in DCM/TFA (9/1, 10mL) and resulting mixture was stirred 1.5 hours at room temperature. Then, solvent was evaporated; residue was dissolved in DCM (10 mL) and treated with saturated NaHCO_3 (aq) (15 mL). Organic phase was separated, water phase was extracted with DCM (2×10 mL). Organic extracts were combined, dried over Na_2SO_4 and evaporated. Yield: 656 mg (90%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 6$ Hz, 3H, H_{26}), 1.27 (s, 28H, H_{12-25}), 1.71 (m, 2H, H_{11}), 2.44 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_{10}), 2.64 (m, 4H, $\text{H}_{7,8}$), 7.04 (t, $J = 7$ Hz, 1H, H_4), 7.34 (m, 1H, H_3), 7.55 (dd, $J = 7$ Hz, 1H, H_5), 8.40 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H_2), 8.91 (s, 1H, NH), ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.1 (C_{26}), 22.7, 25.6, 29.2, 29.5, 29.7, 31.9 (C_{11-25}), 36.3 (C_{10}),

38.1 (C₇), 40.5 (C₈), 121.0 (C₄), 122.3 (C₃), 129.8 (C₂), 133.3 (C₅), 136.5 (C₁), 137.8 (C₆), 171.9 (CO). IR (ν , cm⁻¹) : 3471 (ν NH₂), 2918 (ν C-H), 1682 (ν C=O), 1523 (ν N-H), 1509 (ν C=C), 1288 (ν C-N). ESI-HRMS (m/z) : found : 435.7212 (M+H⁺) (calc for C₂₆H₄₇N₂OS : 435.7219).

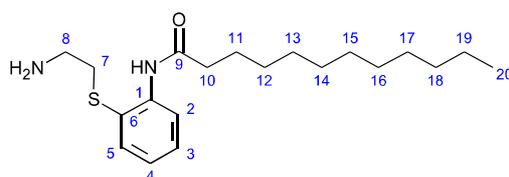
6. Synthesis of N-(2-((2-aminoethyl)thio)phenyl)palmitamide 24-p



Following procedure B : Compound **24-p** was prepared from tert-Butyl (2-((2-palmitidophenyl)thio)ethyl)carbamate **23-p** (759 mg, 1.50 mmol). Yield: 535 mg (88%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.89 (t, J = 6 Hz, 3 H, H₂₄), 1.27 (m, 24 H, H₁₂₋₂₃), 1.75 (s, 2 H, H₁₁), 2.45 (q, J = 7 Hz, 2H, H₁₀), 2.66 (m, 4 H, H_{7,8}), 7.05 (t, J = 7 Hz, 1H, H₄), 7.34 (t, J = 7 Hz, 1H, H₃), 7.51 (m, 1H, H₅), 8.34 (d, J = 7 Hz, 1H, H₂), 8.83 (s, 1 H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.1 (C₂₄), 23.1, 25.6, 29.2, 29.3, 29.6, 29.8 (C₁₁₋₂₃), 36.1 (C₁₀), 38.4 (C₇), 40.5 (C₈), 121.5 (C₄), 123.7 (C₃), 130.9 (C₂), 134.9 (C₅), 137.7 (C₁), 138.8 (C₆), 171.3 (CO). IR (ν , cm⁻¹) : 3472 (ν NH₂), 2918 (ν C-H), 1684 (ν C=O), 1522 (ν N-H), 1508 (ν C=C), 1290 (ν C-N). ESI-HRMS (m/z) : found : 407.3186 (M+H⁺) (calc for C₂₄H₄₄N₂OS : 407.3184).

7. Synthesis of N-(2-((2-aminoethyl)thio)phenyl)lauramide 24-l

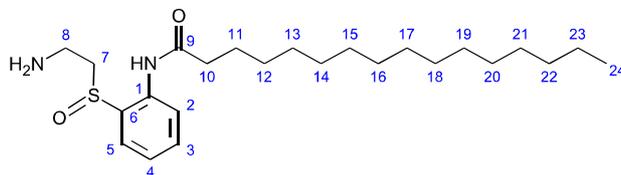


Following procedure B : Compound **24-l** was prepared from tert-Butyl (2-((2-lauridophenyl)thio)ethyl)carbamate **23-l** (675 mg, 1.50 mmol). Yield: 462 mg (80%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.89 (t, J = 6 Hz, 3 H, H₂₀), 1.26 (m, 16 H, H₁₂₋₁₉), 1.76 (q, J = 7 Hz, 2 H, H₁₁), 2.44 (t, J = 7 Hz, 2 H, H₁₀), 2.63 (m, 4 H, H_{7,8}), 7.04 (t, J = 7 Hz, 1 H, H₄), 7.34 (t, J = 7 Hz, 1 H, H₃), 7.53 (d, J = 7 Hz, 1 H, H₅), 8.39 (d, J = 8 Hz, 1 H, H₂), 8.92 (s, 1 H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.8 (C₂₀), 22.4, 25.4, 29.0, 29.1, 29.2, 29.4, 31.8 (C₁₁₋₁₉), 36.3 (C₁₀), 37.7 (C₇), 40.2 (C₈), 120.3 (C₄), 123.5 (C₃), 129.6 (C₂), 135.4 (C₅), 138.3 (C₁), 139.9 (C₆), 171.2 (CO). IR (ν , cm⁻¹) : 3471 (ν NH₂), 2918 (ν C-H), 1679 (ν

C=O), 1522 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1507 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1283 ($\nu_{\text{C-N}}$). ESI-HRMS (m/z) : found : 351.5617 ($\text{M}+\text{H}^+$) (calc for $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{OS}$: 351.5618).

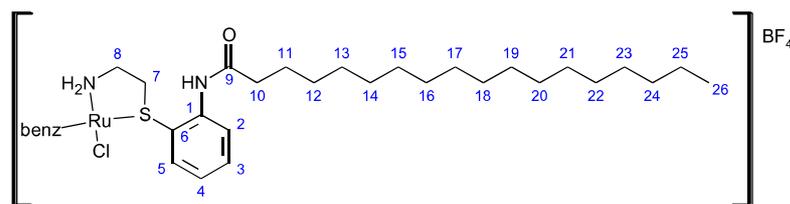
8. Synthesis of N-{2-[(2-aminoethyl)sulfinyl]phenyl}palmamide 26-p



Hydrogen peroxide (30 % in water, 74 μL , 0.73 mmol) was added to **23-p** (300 mg, 0.73 mmol) in methanol at $-70\text{ }^\circ\text{C}$. The reaction was slowly warmed to room temperature and stirred overnight. It was evaporated to dryness to afford a brown solid. Yield: 277 mg (90%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.92 (t, $J = 6$ Hz, 3 H, H_{24}), 1.30 (m, 28 H, H_{12-23}), 2.47 (t, $J = 7$ Hz, 2 H, H_{11}), 2.59 (t, $J = 7$ Hz, 2 H, H_{10}), 2.69 (m, 4 H, $\text{H}_{7,8}$), 7.08 (t, $J = 7$ Hz, 1 H, H_4), 7.37 (t, $J = 7$ Hz, 1 H, H_3), 7.55 (m, 1 H, H_5), 8.38 (d, $J = 7$ Hz, 1 H, H_2), 8.86 (s, 1 H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.3 (C_{24}), 23.1, 25.7, 29.2, 29.3, 29.5, 31.9, (C_{12-23}), 36.4 (C_{10}), 38.7 (C_7), 40.9 (C_8), 120.9 (C_4), 121.2 (C_3), 124.2 (C_2), 130.3 (C_5), 135.0 (C_1), 136.7 (C_6), 171.6 (CO). IR (ν , cm^{-1}) : 3471 (ν_{NH_2}), 2918 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1679 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1522 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1507 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1283 ($\nu_{\text{C-N}}$), 1030 ($\nu_{\text{S=O}}$). ESI-HRMS (m/z) : found : 423.3693 ($\text{M}+\text{H}^+$) (calc for $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{OS}$: 423.3698).

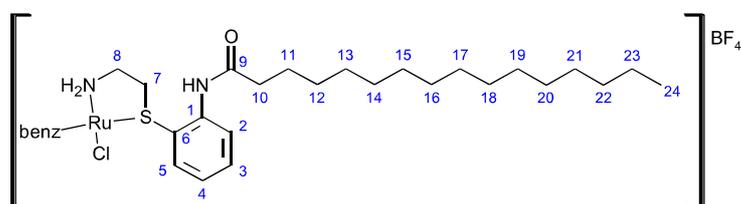
9. Synthesis of Ruthenium complex 25-sa



General procedure C : N-(2-((2-aminoethyl)thio)phenyl)stearamide **24-s** (100 mg, 0.23 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and benzene ruthenium(II) chloride dimer (58 mg, 0.115 mmol) was added. Resulting mixture was stirred overnight, then NH_4BF_4 (28 mg, 0.27 mmol) was added and mixture was stirred for another 1 h. Then, solvent was evaporated and residue was dissolved in DCM (15 mL), solution was filtered through Celite. Filtrate was evaporated and residue was triturated with PE. Yield: 131 mg (78%).

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.86 (t, $J = 7$ Hz, 3H, H_{26}), 1.24 (s, 28H, H_{12-25}), 1.75 (m, 2H, H_{11}), 2.48 (s, 2H, H_{10}), 2.97 (m, 3H, $\text{H}_{7,8}$), 3.05 (s, 1H, H_7), 5.75 (s, 6H, H_{benz}), 7.50 (m, 2H, $\text{H}_{3,4}$), 7.67 (m, 1H, H_5), 7.94 (m, 1H, H_2), 8.09 (m, 1H, NH). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.23 (C_{26}), 22.8, 25.8, 29.4 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 29.9, 32.8 (C_{11-25}), 37.1 (C_{10}), 40.3 (C_7), 43.5 (C_8), 86.42 (C_{benz}), 126.7 (C_4), 126.9 (C_3), 128.4 (C_2), 132.1 (C_5), 137.9 (C_1), 139.3 (C_6), 173.3 (CO). IR (ν , cm^{-1}): 3450 (ν_{NH_2}), 2944 (ν_{CH}), 1767 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1595 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1557 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1222 ($\nu_{\text{C-N}}$). ESI-HRMS (m/z): found : 648.3481 ($\text{M}+\text{H}^+$) (calc for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{OSRuCl}$: 648.3486).

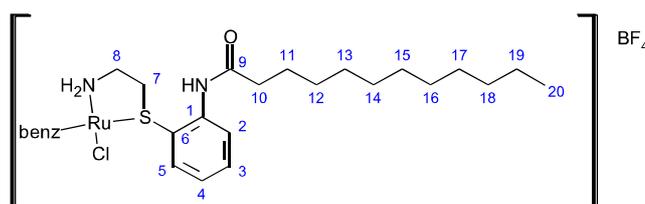
10. Synthesis of Ruthenium complex 25-pa



Following procedure C : N-(2-((2-aminoethylthio)phenyl)palmitamide **24-p** (203 mg, 0.50 mmol), benzene ruthenium(II) chloride dimer (126mg, 0.25 mmol) and NH_4BF_4 (60 mg, 0.58 mmol). Yield: 220 mg (71%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.87 (t, $J = 6$ Hz, 3 H, H_{24}), 1.25 (s, 24 H, H_{12-23}), 1.74 (m, 2 H, H_{11}), 2.47 (m, 2 H, H_{10}), 2.92 (m, 3 H, $\text{H}_{7,8}$), 3.07 (s, 1 H, H_7), 5.71 (s, 6 H, H_{benz}), 7.47 (m, 2 H, $\text{H}_{3,4}$), 7.59 (m, 1 H, H_5), 7.85 (m, 1 H, H_2), 8.28 (s, 1 H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.1 (C_{24}), 22.6, 25.6, 29.3, 29.6, 29.9, 31.9 (C_{11-23}), 36.8 (C_{10}), 37.9 (C_7), 41.0 (C_8), 86.1 (C_{benz}), 127.0 (C_4), 127.2 (C_3), 131.9 (C_2), 132.0 (C_5), 137.8 (C_1), 139.0 (C_6), 173.3 (CO). IR (ν , cm^{-1}): 3455 (ν_{NH_2}), 2930 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1764 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1596 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1560 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1225 ($\nu_{\text{C-N}}$). ESI-HRMS (m/z): found : 621.2339 ($\text{M}+\text{H}^+$) (calc for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{OSRuCl}$: 621.2340).

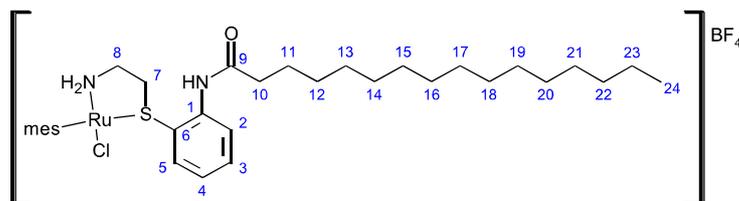
11. Synthesis of Ruthenium complex 25-la



Following procedure C : N-(2-((2-aminoethyl)thio)phenyl)lauramide **24-l** (175 mg, 0.50 mmol), benzene ruthenium(II) chloride dimer (126mg, 0.25 mmol) and NH₄BF₄ (60 mg, 0.58 mmol). Yield: 183 mg (65%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, *J* = 6 Hz, 3 H, H₂₀), 1.26 (s, 16 H, H₁₂₋₁₉), 1.78 (m, 2 H, H₁₁), 2.48 (m, 2 H, H₁₀), 2.90 (m, 3 H, H_{7,8}), 3.08 (s, 1 H, H₇), 5.76 (s, 6 H, H_{benz}), 7.51 (m, 2 H, H_{3,4}), 7.70 (m, 1 H, H₅), 7.94 (m, 1 H, H₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.8 (C₂₀), 22.4, 29.0, 29.3, 29.4, 29.9, 31.6 (C₁₂₋₁₉), 36.4 (C₁₀), 37.8 (C₇), 40.7 (C₈), 85.8 (C_{benz}), 126.7 (C₄), 126.8 (C₃), 131.3 (C₂), 131.6 (C₅), 137.5 (C₁), 139.0 (C₆), 173.0 (CO). IR (ν, cm⁻¹) : 3445 (ν NH₂), 2947 (ν C-H), 1763 (ν C=O), 1596 (ν N-H), 1557 (ν C=C), 1287 (ν C-N). ESI-HRMS (m/z): found : 565.2098 (M+H⁺) (calc for C₂₆H₃₉N₂OSRuCl : 565.2096

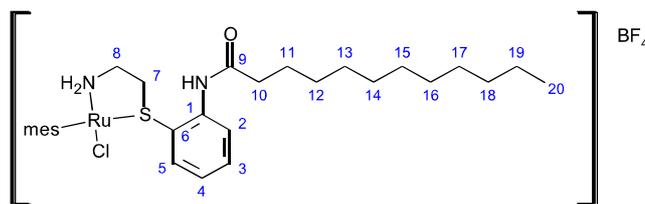
12. Synthesis of Ruthenium complexes 25-pb



Following procedure C : N-(2-((2-aminoethyl)thio)phenyl)palmamide **24-p** (120 mg, 0.29 mmol), mesitylene ruthenium(II) chloride dimer (76 mg, 0.15 mmol) and NH₄BF₄ (35 mg, 0.33 mmol). Yield: 115 mg (60%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, *J* = 6 Hz, 3 H, H₂₄), 1.26 (s, 24 H, H₁₂₋₂₃), 1.45 (s, 9H, H_{mes}), 1.76 (m, 2 H, H₁₁), 2.48 (m, 2 H, H₁₀), 2.92 (m, 3 H, H_{7,8}), 3.12 (s, 1 H, H₇), 5.69 (s, 3 H, H_{mes}), 7.51 (m, 2 H, H_{3,4}), 7.70 (m, 1 H, H₅), 7.84 (m, 1 H, H₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 13.8 (C₂₄), 19.9 (C_{mes}), 22.4, 25.3, 29.0, 29.3, 29.4, 31.6 (C₁₁₋₂₃), 36.3 (C₁₀), 39.7 (C₇), 43.3 (C₈), 126.7 (C₄), 126.8 (C₃), 132.3 (C₂), 134.5 (C₅), 138.7 (C₁), 139.0 (C₆), 141.3 (C_{mes}), 142.6 (C_{mes}), 173.0 (CO). IR (ν, cm⁻¹) : 3434 (ν NH₂), 2939 (ν C-H), 1760 (ν C=O), 1587 (ν N-H), 1570 (ν C=C), 1222 (ν C-N). ESI-HRMS (m/z) : found : 663.3747 (M+H⁺) (calc for C₃₃H₅₃N₂OSRuCl : 663.3765).

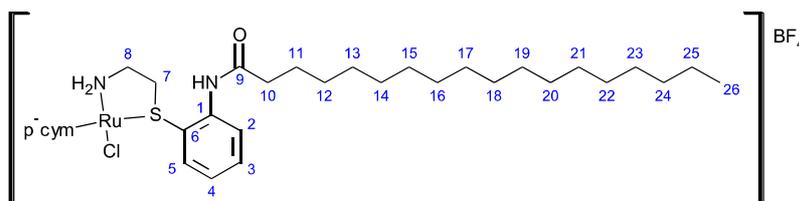
13. Synthesis of Ruthenium complexes 25-lb



Following procedure C : N-(2-((2-aminoethyl)thio)phenyl)lauramide **24-l** (100 mg, 0.29 mmol), mesityleneruthenium (II) chloride dimer (76 mg, 0.15 mmol) and NH₄BF₄ (35 mg, 0.33 mmol). Yield: 102 mg (58%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, *J* = 6 Hz, 3 H, H₂₀), 1.26 (s, 16 H, H₁₂₋₁₉), 1.45 (s, 9 H, H_{mes}), 1.78 (m, 2 H, H₁₁), 2.48 (m, 2 H, H₁₀), 2.90 (m, 3 H, H_{7,8}), 3.10 (s, 1 H, H₇), 5.69 (s, 3 H, H_{mes}), 7.52 (m, 2 H, H_{3,4}), 7.71 (m, 1 H, H₅), 7.95 (m, 1 H, H₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.0 (C₂₀), 19.9 (C_{mes}), 22.4, 25.3, 29.0, 29.3, 29.7, 31.3 (C₁₁₋₁₉), 36.7 (C₁₀), 39.9 (C₇), 43.6 (C₈), 126.7 (C₄), 126.9 (C₃), 132.6 (C₂), 134.8 (C₅), 139.1 (C₁), 139.3 (C₆), 141.3 (C_{mes}), 142.6 (C_{mes}), 173.0 (CO). IR (ν, cm⁻¹) : 3449 (ν_{NH2}), 2946 (ν_{C-H}), 1768 (ν_{C=O}), 1594 (ν_{N-H}), 1557 (ν_{C=C}), 1232 (ν_{C-N}). ESI-HRMS (m/z) : found : 607.2684 (M+H⁺) (calc for C₂₉H₄₆N₂OSRuCl: 607.7150).

14. Synthesis of Ruthenium complexes 25-sc

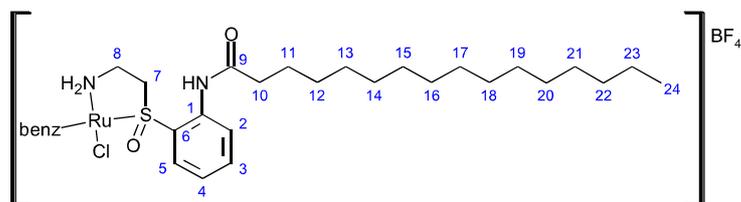


Following procedure C : N-(2-((2-aminoethyl)thio)phenyl)stearamide **24-s** (100 mg, 0.29 mmol), p-cymene ruthenium (II) chloride dimer (76 mg, 0.15 mmol) and NH₄BF₄ (35 mg, 0.33 mmol). Yield: 102 mg (58%).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.86 (t, *J* = 7 Hz, 3H, H₂₆), 1.24 (s, 28H, H₁₂₋₂₅), 1.75 (m, 2H, H₁₁), 2.15 (s, 2H, H_{p-cym}), 2.48 (m, 2H, H₁₀), 2.69 (s, 2H, H_{p-cym}), 2.97 (m, 3H, H_{7,8}), 3.05 (s, 1H, H₇), 5.75 (s, 1H, H_{p-cym}), 5.70 (s, 1H, H_{p-cym}), 5.30 (s, 1H, H_{p-cym}), 7.50 (m, 2H, H_{3,4}), 7.67 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₅), 7.94 (t, *J* = 5 Hz, 1H, H₂), 8.09 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.23 (C₂₆), 21.2 (C_{p-cym}), 22.8, 25.8, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 29.9, 32.0 (C₁₁₋₂₅), 37.1 (C₁₀), 40.3 (C₇), 43.5 (C₈), 126.3 (C_{p-cym}), 126.7 (C₄), 126.9 (C₃), 128.4 (C₂),

129.7 ($C_{chp-cym}$), 132.1 (C_5), 137.9 (C_1), 139.3 (C_6), 140.3 (C_{p-cym}), 145.8 (C_{p-cym}), 173.3 (CO).
 IR (ν , cm^{-1}) : 3450 (ν_{NH_2}), 2944 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1767 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1595 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1557 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1222 ($\nu_{\text{C-N}}$).
 ESI-HRMS (m/z) : found : 648.3481 ($\text{M}+\text{H}^+$) (calc for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{OSRuCl}$: 648.7690).

15. Synthesis of Ruthenium complexes 27-pa



Following procedure C : *N*-{2-[(2-aminoethyl)sulfinyl]phenyl}palmamide **26-p** (150 mg, 0.35 mmol), benzeneruthenium(II) chloride dimer (88 mg, 0.175 mmol) and NH_4BF_4 (42 mg, 0.49 mmol). Yield: 122 mg (55%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.88 (t, $J = 6$ Hz, 3 H, H_{24}), 1.26 (s, 24 H, H_{12-23}), 1.75 (m, 2 H, H_{11}), 2.48 (m, 2 H, H_{10}), 2.83 (m, 3 H, $\text{H}_{7,8}$), 3.08 (s, 1 H, H_7), 5.72 (s, 6 H, H_{benz}), 7.48 (m, 2 H, $\text{H}_{3,4}$), 7.60 (m, 1 H, H_5), 7.86 (m, 1 H, H_2), 8.29 (s, 1 H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.1 (C_{24}), 22.4, 25.3, 29.0, 29.3, 29.6, 31.9 (C_{11-23}), 36.4 (C_{10}), 37.1 (C_7), 46.7 (C_8), 86.1 (C_{benz}), 127.0 (C_4), 127.3 (C_3), 131.9 (C_2), 132.1 (C_5), 137.8 (C_1), 139.0 (C_6), 173.3 (CO). IR (ν , cm^{-1}) : 3450 (ν_{NH_2}), 2934 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1770 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1592 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1560 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1225 ($\nu_{\text{C-N}}$) 1032 ($\nu_{\text{S=O}}$). ESI-HRMS (m/z) : found : 637.2943 ($\text{M}+\text{H}^+$) (calc for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_2\text{SRuCl}$: 637.8964).

XIII. Circular dichroism spectroscopy.

The CD spectrum of **25-pb** and **25-lp** was obtained by the same method developed in the first experimental part for the palladium.

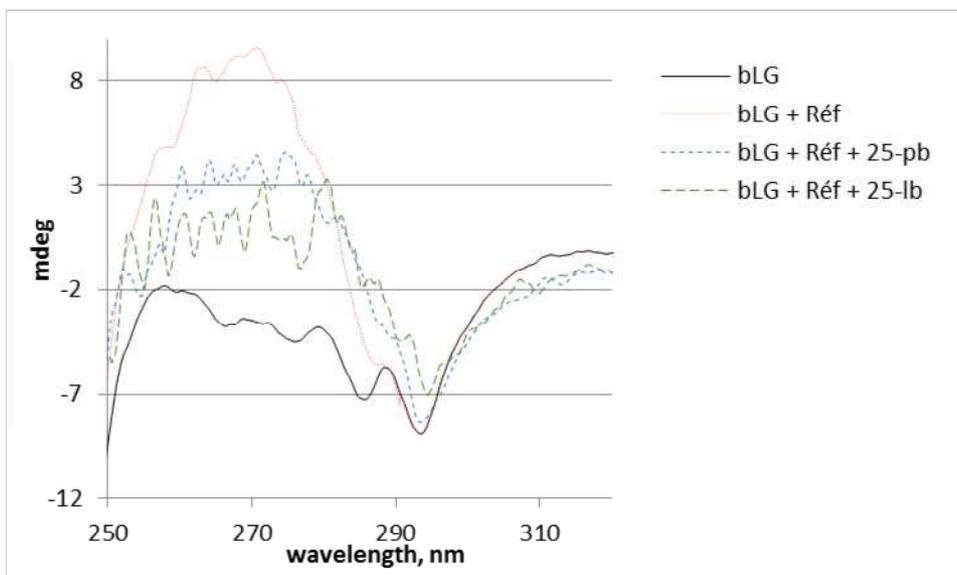


Figure 80 : CD spectrum of β -Lg, β -Lg + Réf , β -Lg + Réf + 25-lb et , β -Lg + Réf + 25-pb.

XIV. Fluorescence spectroscopy.

Calculation of the K_d was obtained by the same method developed in the first experimental part with the palladium.

By plotting $P_0 \times a$ vs $R_0 \times (a/(1-a))$, a straight line is obtained with an intercept of K_d/n and a slope of $1/n$.

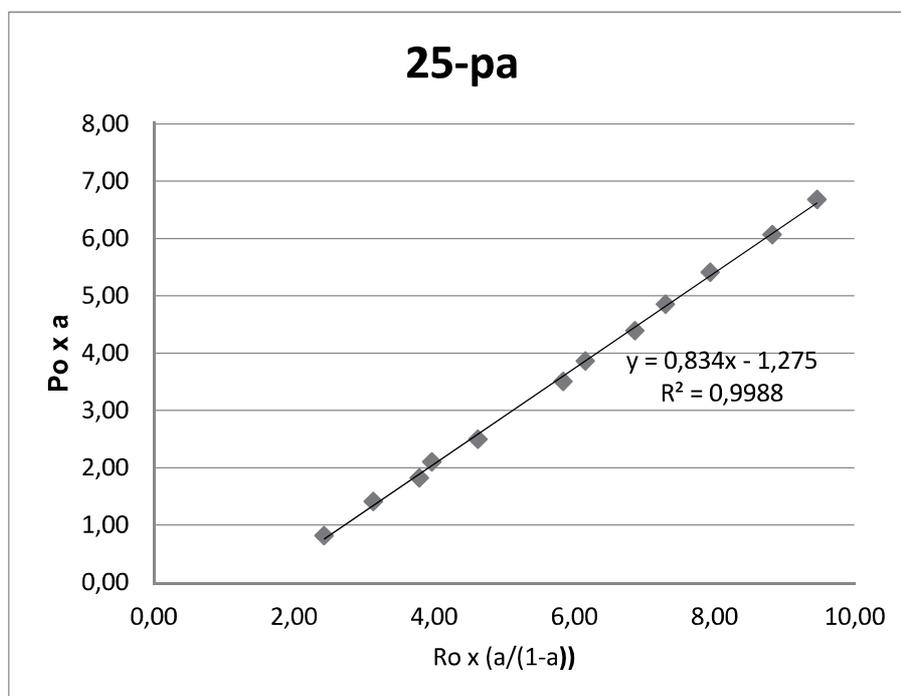


Figure 81 Linear least-square plot of Eqn (1) for the titration of β Lg with 25-pa

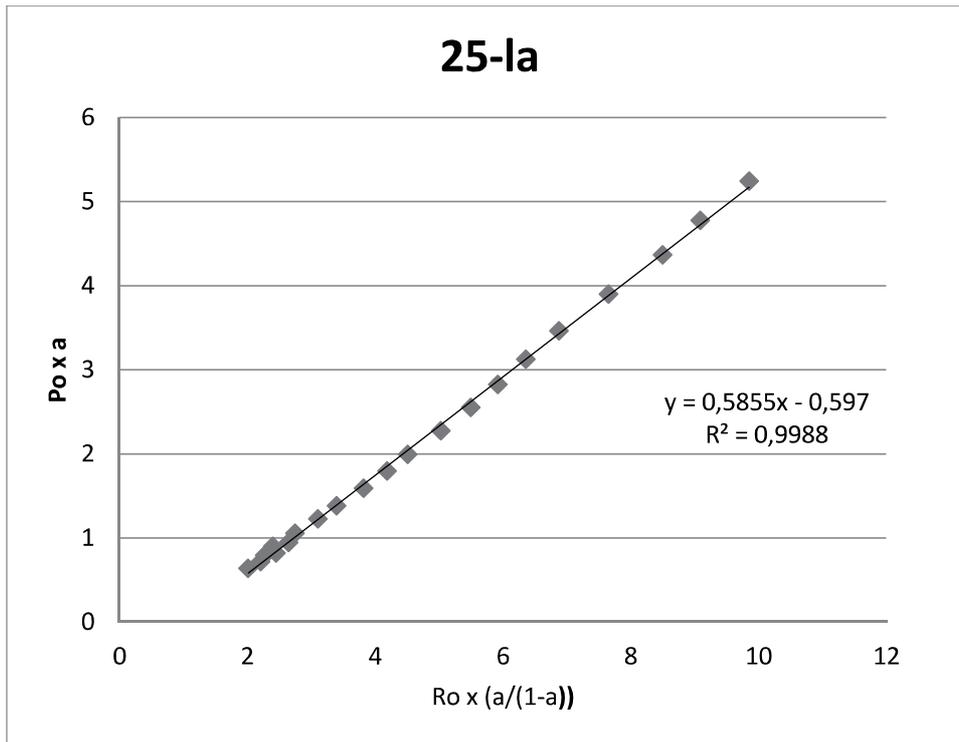


Figure 82 Linear least-square plot of Equation (1) for the titration of β LG with 25-la

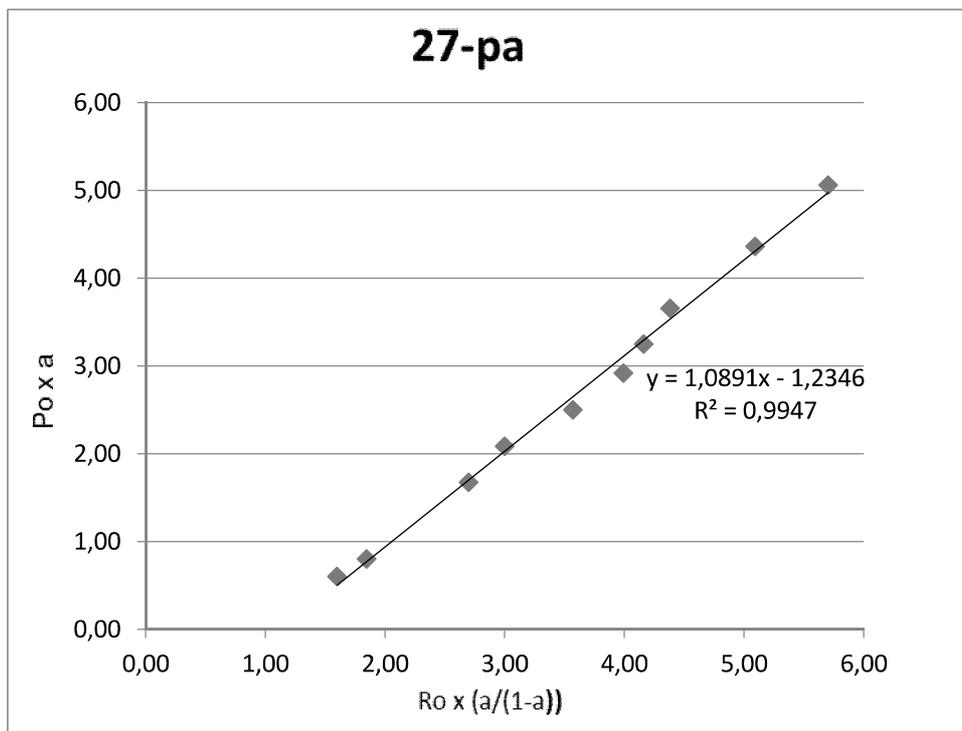


Figure 83 : Linear least-square plot of Equation (1) for the titration of β LG with 27-pa

XV. ATH of Ketones:

A solution of Ruthenium complex (25 μL of 10 mM solution in MeOH, 250 nmol, 1.5 mol%) and ketone (160 μL of 10 mM solution in DMSO, 1.67 μmol) was added in 1 mL of 1M solution of HCOONa pH = 7.5 and the mixture was stirred for up to 48 h at room temperature. The aqueous solution was extracted with diisopropylether (2 x 900 μL). The organic phase was evaporated to dryness, the residue was dissolved in isopropanol (20 μl) and analyzed by chiral GC (*CP-Chirasil-DEX CB (25m x 0,25mm x 0,25 μm)*, *injector : 250°C, split ratio 20; detector FID: 250°C; gas: N₂, 1 mL/min*) to evaluate the conversion and the enantiomeric ratios.

Beta-LG (300 nmol, 2.0 mol%) was solubilized in 1 mL of 1M solution of HCOONa pH = 7.5. A solution of Ruthenium complex (25 μL of 10 mM solution in MeOH, 250 nmol, 1.5 mol%) was added and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. Ketone (160 μL of 10 mM solution, 1.67 μmol) was added and the mixture was stirred for up to 48 h at room temperature. The aqueous solution was extracted with diisopropylether (2 x 900 μL). The organic phase was evaporated to dryness, the residue was dissolved in isopropanol (20 μl) and analyzed by chiral GC.

1. Condition GC and retention times :

Column: *CP-Chirasil-DEX CB (25m x 0,25mm x 0,25μm)*, injector : 250°C, split ratio 20; detector FID: 250°C; gas: N₂, 1 mL/min).

Ketone	Tr (ketone)	Tr alcol (R)	Tr alcohol (S)	Temperature
2-methoxyacetophenone	10,57	27,85	24,85	120 °C
3-methoxyacetophenone	9,09	22,57	24,74	125 °C
4-methoxyacetophenone	10.75	23.54	24.32	125 °C
2-methylacetophenone	5,00	11,01	11.48	120 °C
3-methylacetophenone	8.79	22.7	25.70	110 °C
4-methylacetophenone	6.47	11.08	12.63	120 °C
2-bromoacetophenone	3.68	8.52	10.63	150 °C
2-nitroacetophenone	7.32	19.52	20.83	160 °C
2-fluoroacetophenone	4.12	14.63	16.50	110 °C
trifluoacetophenone	2.50	21.57	22.97	120 °C
Acetophenone	6.00	14.52	16.23	110 °C

2. Condition and enantiomeric ratio :

The enantiomeric ratio was calculated from ratio of enantiomer peaks areas. The conversion was calculated as follow. Since products of the reaction (alcohols) have relatively high solubility in water, conversion was determined by the remained quantity of ketone (less soluble in water, easy extraction).

$$\text{Conversion} = \left(1 - \frac{\text{Number of moles of ketones in final reaction mixture}}{\text{Initial number of moles of ketone}} \right) \times 100$$

In our case, initial number of ketone is equal to 1.67 μmol. Firstly, for the determination of number of moles of ketone in final reaction mixture, relative response factors (RRF) for all the ketones were found by injection of mixtures with exact concentrations of ketone and

naphthalene (200 μL $i\text{Pr}_2\text{O}$ + 10 μL of 1 mg/ml solution of ketone + 5 μL of 5.8mg/mL solution of naphthalene).

$$RRF = \frac{\text{Ketone peak area}}{\text{ketone concentration}} / \frac{\text{Naphthalene peak area}}{\text{naphthalene concentration}}$$

Ketone	RRF
2-methoxyacetophenone	1.41
3-methoxyacetophenone	1.15
4-methoxyacetophenone	1.23
2-methylacetophenone	1.05
3-methylacetophenone	1.45
4-methylacetophenone	1.19
2-bromoacetophenone	1.32
2-nitroacetophenone	1.35
2-fluoroacetophenone	1.24
trifluoroacetophenone	3.03
Acetophenone	0.70

Conversion was determined by using the internal standard (naphthalene). Then, concentrations of ketones in organic extracts were determined by the injection of following mixture: 10 μL aliquot of reaction extract + 2.5 μL of 5.8 mg/mL solution of naphthalene (C_{final} of naphthalene = 1.097 mM). From these experiments the concentration of ketone was calculated by the following equation:

$$C(\text{ketone}) = \frac{\text{ketone peak area}}{\text{naphthalene peak area}} \times \frac{1}{RRF} \times C(\text{naphthalene})$$

Multiplication of this concentration to volume of iPr_2O used for the extraction (in our case 900 μ L) gives us the number of moles of ketone extracted from reaction mixture. This extraction is not total, so extraction coefficients were found for all the substrates.

Ketone	Kex
2-methoxyacetophenone	1.41
3-methoxyacetophenone	1.15
4-methoxyacetophenone	1.23
2-methylacetophenone	1.05
3-methylacetophenone	1.45
4-methylacetophenone	1.19
2-bromoacetophenone	1.32
2-nitroacetophenone	1.35
2-fluoroacetophenone	1.24
trifluoroacetophenone	3.03
Acetophenone	0.70

XVI. ATH of imine:

Beta-LG (300 nmol, 2.0% mol) was solubilized in 1 mL of 1M solution of HCOONa pH = 7.5. A solution of ruthenium complex (25 μ L of 10 mM solution, 250 nmol, 1.5 mol%); was added and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. Imine (160 μ L of 10 mM solution, 1.67 μ mol) was added and the mixture was stirred for up to 48 h at room temperature. The aqueous solution was extracted with diisopropylether (2 x 900 μ L). The organic phase was evaporated to dryness, the residue was dissolved in hexane/isopropanol 1:1 (100 μ L) and analyzed by chiral HPLC to evaluate the conversion and the enantiomeric ratios.

a. Condition GC and retention times :

Column : *Kromasil 5-cellucoat, with hexane/isopropanol 96/4 for 15 min at 1 mL/min.*

Retention time : Imine at 5.21 mn, and product at 9.60 and 11.35 mn.

CHAPITRE 4

I. Complexes NHC

Le premier complexe métallique pour lequel le métal est coordonné par un carbène N-hétérocyclique (NHC) a été introduit par Öfele et Wanzlick en 1968¹, et l'isolement du premier NHC stable par Arduengo en 1991². Il a été obtenu par déprotonation du sel d'imidazolium précurseur à l'aide d'une base, le chlorure de N, N'-di(adamantyl)imidazolium (Schéma 48).

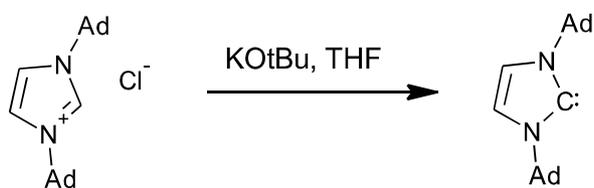


Schéma 48 : Synthèse du premier NHC libre

Depuis, la chimie des NHCs connaît un développement croissant et cet intense effort de recherche a permis la conception d'architectures toujours plus élaborées et variées. De nos jours, les composés NHCs sont devenus omniprésents dans la littérature. Initiés par les travaux de Bertrand, Grubbs, Herrmann, Nolan, Orgue, et d'autres, les ligands NHC ont été utilisés pour catalyser une multitude de réactions avec de nombreux métaux différents employés.^{3, 4, 5, 6} Parmi ceux-ci, il convient de mentionner le ruthénium comme centre catalytique pour la métathèse d'oléfines et le palladium pour les réactions de couplage croisé. Leur utilisation en milieu organique est très développée et connue.

L'utilisation de l'eau avec ce type de complexe offre un nouveau domaine d'exploitation intéressant, permettant d'accéder à de nouvelles réactions potentielles. Ce milieu est une condition importante pour la construction d'ArMs. La préexistence d'un certain nombre de réactions en milieu aqueux présente un sérieux avantage et c'est pourquoi on s'est principalement intéressé aux complexes NHCs dans l'eau.

Cependant, avec de l'eau souvent considérée comme l'«ennemi naturel» des espèces organométalliques, la majorité de ces réactions a été réalisée dans des solvants organiques

secs. Une fois de plus, Breslow a été le premier à proposer la catalyse par des complexes NHC dans l'eau.⁷ En 2009, Shaughnessy a publié quelques exemples de complexes métalliques avec des NHC hydrosolubles.⁸ En outre, des exemples ont été mentionnés dans le travail de Bierenstiel dédié aux NHC fonctionnalisés par le soufre ou de Young sur les complexes d'argent.^{9, 10} Pourtant, aucun examen complet consacré au champ en expansion rapide des NHC solubles dans l'eau n'est apparu jusqu'à présent. Un nombre impressionnant de composés contenant NHC ont été signalés depuis la naissance de la chimie des complexes de métaux de transition à ligands NHC.¹¹ Dans la plupart des cas, les réactions dans l'eau sont décrites avec des complexes NHC solubles, cependant, la solubilité dans l'eau n'est pas due au ligand NHC, lui-même mais plutôt à la fonction SO_3^- qui est souvent rajoutée.

Néanmoins l'utilisation de l'eau comme solvant de réaction reste restreinte ; cela peut être attribué à deux raisons principales: la première est la labilité des complexes organométalliques dans un environnement aqueux, et le second est l'effet hydrophobe qui limite fortement la solubilité de matières organiques non polaires. D'autre part, les motivations pour l'utilisation de l'eau dans les réactions organiques sont tout à fait évidentes.¹² De plus le nombre d'études sur la catalyse avec des complexes de NHC dans l'eau ne cesse d'augmenter.¹³

1. Caractéristiques des NHCs libres

a. *Propriétés électroniques des NHCs libres*

D'un point de vue électronique, les NHCs possèdent une orbitale σ dans le plan de l'hétérocycle et une orbitale $p\pi$ perpendiculaire à ce plan. L'orbitale σ est remplie par deux électrons et la $p\pi$ reste vacante, ils sont donc considérés comme des NHCs singulets et des NHCs riches en électrons.¹⁴ Cette répartition électronique s'explique par l'interaction de l'orbitale $p\pi$ vacante avec les orbitales $p\pi$ des atomes donneurs voisins qui augmente l'écart énergétique entre les deux orbitales du NHC.¹⁵

b. Propriétés électroniques des liaisons métal-NHC



Figure 84 : Propriétés électroniques de la liaison M-NHC.

Les propriétés des NHCs libres dictent les caractéristiques de la liaison métal-NHC. Ce sont des ligands riches en électrons et très fortement σ donateurs qui forment avec les métaux de transitions des complexes très stables (Figure 84). Comme ce sont des NHCs singulets, ils sont considérés comme des ligands L dans le formalisme de Green. Leur caractère π accepteur est influencé par la nature du métal, des co-ligands, l'architecture et l'orientation du NHC. Longtemps, les NHCs ont été considérés comme des ligands très faiblement π accepteurs,^{16, 17} mais il est maintenant établi que la rétro-donation du métal vers le ligand peut aller jusqu'à 30% de l'énergie totale d'interaction orbitalaire du complexe et contribuer de manière importante à la stabilisation du centre métallique.¹⁸ Les propriétés électroniques d'un ligand NHC peuvent être quantifiées expérimentalement par spectroscopie infrarouge en comparant les bandes de vibration CO des complexes $\text{RhL}(\text{CO})_2\text{Cl}$, $\text{IrL}(\text{CO})_2\text{Cl}$, $\text{NiL}(\text{CO})_3$ ou encore $\text{LCr}(\text{CO})_5$ où $\text{L} = \text{NHC}$ ou PR_3 .¹⁹ Ces expériences montrent que les NHCs sont des ligands plus donateurs que les alkylphosphines les plus basiques. Cependant il apparaît que leurs propriétés donneuses ne sont que faiblement influencées par la nature des substituants R portés par les atomes d'azote. En effet, contrairement aux phosphines dans lesquelles les différents groupements R sont directement liés à l'atome donneur et induisent des variations importantes des propriétés électroniques, les substituants des azotes dans les NHCs sont éloignés du centre carbénique donneur, ce qui limite leur influence.

2. Complexes NHC-Au

Comme l'a déclaré Hashmi dans son examen approfondi sur la chimie, l'or évoque toute une histoire de l'art, de la politique et du pouvoir financier, et est responsable des altérations géopolitiques et des guerres.²⁰ Cependant, l'or a été beaucoup moins exploré en chimie. Les raisons de cela peuvent être attribuées au caractère «inerte» attribué à l'or et à son prix élevé.

Les complexes d'or étant des acides de Lewis doux, ils se caractérisent par une grande affinité vis-à-vis des triples liaisons. Ainsi, de nombreux substrats de type alcyne peuvent être facilement activés par la coordination des liaisons riches en électrons π aux centres métalliques.

a. Réaction d'hydratation d'allyle

Une des réactions les plus développées avec des complexes de NHC-Au en milieu aqueux est l'hydratation d'allène et d'allyle.

L'hydratation de l'acétylène en acétaldéhyde catalysée par les sels mercuriques a été découverte par Kucherov en 1881.²¹ Pendant de nombreuses années, ce procédé industriel pour la synthèse de l'acétaldéhyde a été utilisé jusqu'à ce que des procédés plus lucratifs soient inventés. L'avènement de la chimie de l'or a récemment ouvert de nouvelles voies douces vers l'hydratation des alcynes pour la production de dérivés d'aldéhydes et de cétones.

Le premier complexe d'or catalytiquement actif portant un ligand NHC a été rapporté par Herrmann et ses collègues en 2003.²² Le complexe NHC-**Au-1** a été préparé par un procédé de transmétallation avec l'argent et a ensuite été utilisé pour préparer le complexe NHC-**Au-2** par addition d'acétate d'or (Schéma 49).

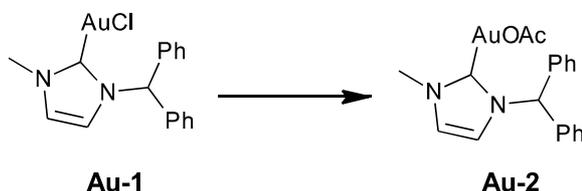


Schéma 49 : Formation d'**Au-2** à partir d'**Au-1**

Bien que ces complexes n'aient pas montré d'activité catalytique dans l'eau comme solvant, l'eau est évidemment utilisée pour l'hydratation catalytique des alcynes. Le mélange de 3-hexyne avec 4 équivalents d'eau dans le THF, 0,5 mol% de **Au-2** et 2,5 mol% de tris(pentafluorophényl)bore en tant que cocatalyseur a donné un rendement de 20% en cétone correspondante en 15 min à 40 °C. Malgré les mauvais résultats obtenus avec **Au-2**, ces premières recherches ont ouvert la voie à de nombreuses publications sur les complexes NHC-Au catalytiquement actifs et leur activité dans et avec l'eau.

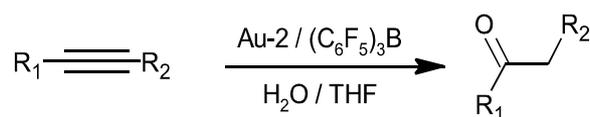


Schéma 50 : Réaction d'hydratation d'alcyne en présence de Au-2.

En 2009, l'hydratation d'allènes catalysée par **Au-3** a été étudiée par Widenhoefer *et al.* Dans ces recherches l'hydratation du 2,3-pentadiényle allène a été réalisée en présence de deux équivalents d'eau. Les meilleurs résultats ont été obtenus dans le dioxane, où le produit est obtenu avec un rendement de 63%.²³

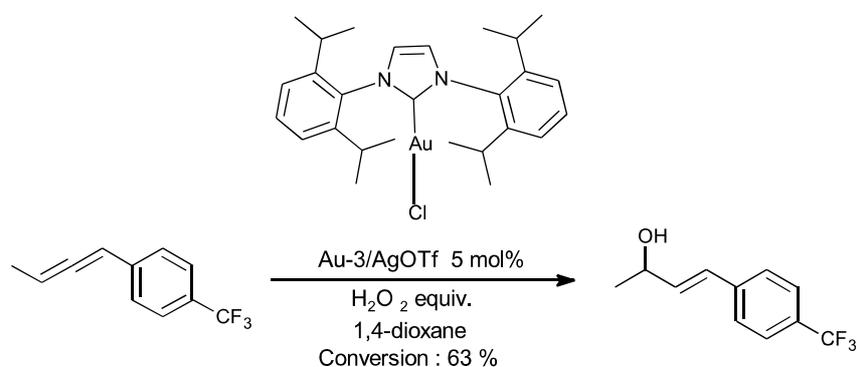


Figure 85 : Hydratation d'allène catalysée par Au-3.

b. Réaction d'hydroamination intramoléculaire

Comme il ressort de ce qui précède, la littérature sur la catalyse aqueuse à l'or est principalement consacrée à des hydratations d'allène et d'alcyne. Cependant, la stabilité et l'acidité de Lewis des complexes d'or permettent également à d'autres réactions d'être réalisées, par exemple, des réactions de cyclisation. En effet, Widenhoefer et son équipe ont décrit la réaction d'hydroamination intramoléculaire sur une urée qui est efficacement catalysée par le complexe **Au-3** et AgOTf comme co-catalyseur à température ambiante dans du méthanol aqueux produisant alors des rendements presque quantitatifs.²⁴

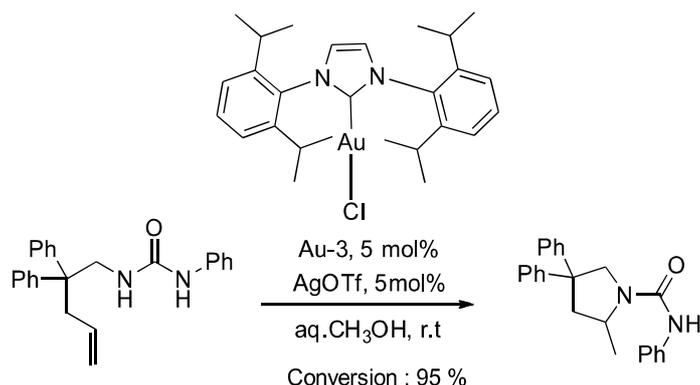


Schéma 51 : Réaction d'hydroamination intramoléculaire catalysée par Au-4 et AgOTf

c. Synthèses de furane et d'indole

En 2011, le groupe de Nolan a rapporté la synthèse de furanes catalysée par des complexes NHC-Au. Les catalyseurs choisis pour la tâche étaient le complexe **Au-3** et le complexe **Au-4** en présence d'acide. La recherche de différentes conditions de réaction à l'aide de 1,4-diphénylbuta-1,3-diyne en tant que substrat et de **Au-3** ou **Au-4** en tant que catalyseurs, ont conduit aux conditions optimisées suivantes : 1 mol% de **Au-4** et 1,5 mol% de HNTf₂ à 80 °C dans dioxane / H₂O (2 : 1).²⁵

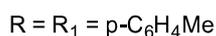
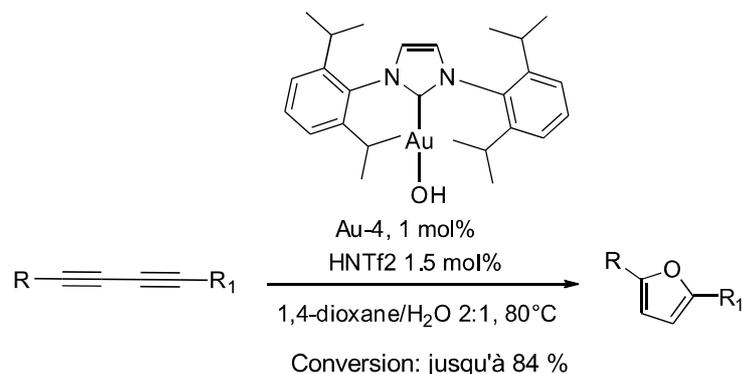


Schéma 52 : Synthèse de furanes catalysée par Au-4

Ye et ses collaborateurs ont publié le premier exemple de génération de carbènes d'or grâce à l'oxydation intermoléculaire des ynamides dans des milieux aqueux. Par rapport aux carbénoïdes métalliques traditionnels, formés à partir de la décomposition par voie métallique

de composés diazo, cette espèce carbénoïde est générée via une oxydation d'alkyne intermoléculaire catalysée par l'or et ces réactions pertinentes peuvent être réalisées dans des milieux aqueux (Schéma 53).²⁶

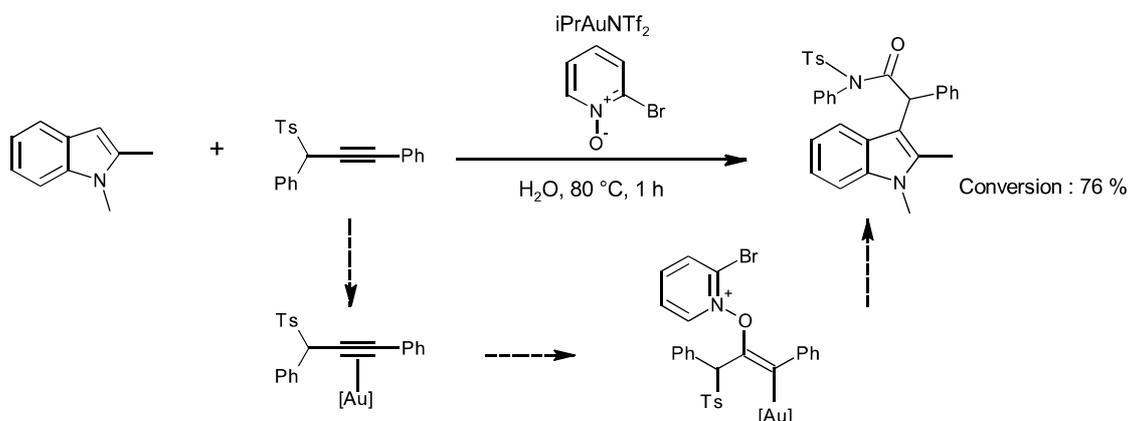


Schéma 53 : Formation d'indole fonctionnalisé.

En utilisant cette approche, ils ont réalisé la fonctionnalisation inter-moléculaire C-H d'indoles par des carbènes d'or α -oxo générés par oxydation de ynamides. En outre, cette chimie a également été étendue avec succès à un substrat indole 2-substitué, conduisant à la formation du produit correspondant avec un rendement de 76%. Par la suite, inspirés par ces résultats, ils ont envisagé de réaliser la réaction de cycloisomérisation catalysée par l'or dans l'eau et donc la fonctionnalisation C-H intermoléculaire mentionnée ci-dessus des indoles par des carbènes d'or α -oxo serait obtenue par une stratégie tandem one-pot ou une catalyse en tandem simultanée directement à partir des o-alcynyl-anilines facilement disponibles. De manière significative, le catalyseur d'or sert à deux fonctions distinctes en même temps, fournissant un nouveau type de catalyse tandem simultanée.²⁷

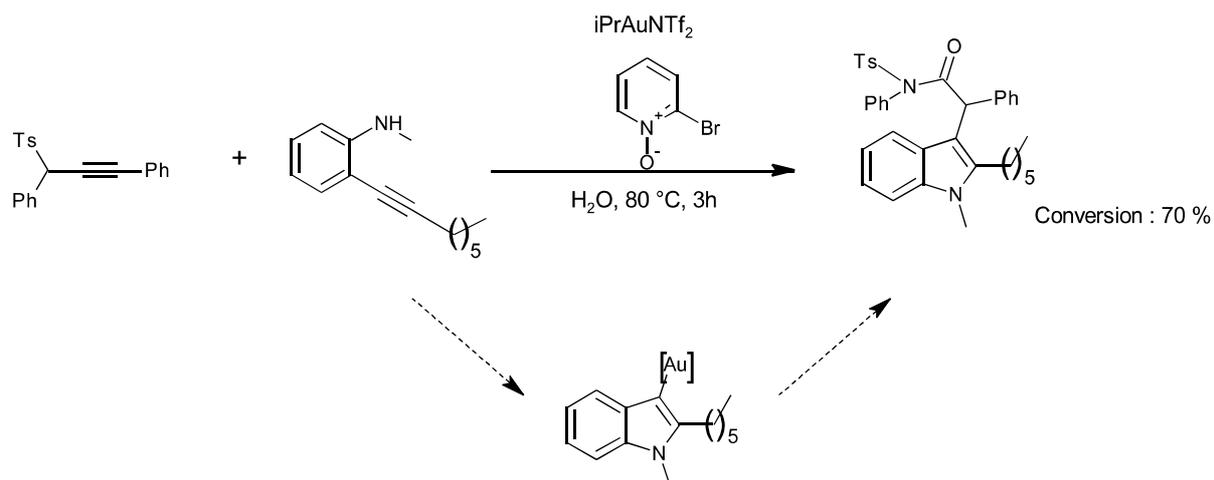


Schéma 54 : Formation d'indole fonctionnalisé par catalyse à l'or.

3. ArMs – NHC

Même si les complexes NHCs existent depuis un certain temps et ont été largement utilisés avec différents types de métaux tels que l'or, le rhodium, le ruthénium et le palladium, afin de réaliser un nombre divers de réactions en milieu organique mais aussi en milieu aqueux, il existe finalement assez peu de métalloenzymes qui mettent en jeu des NHCs.

a. Les ions imidazolium.

En 2014, Gauchot *et al.* sont parvenus à concevoir un système hybride constitué d'une ancre biotinylée à base d'imidazolium et un anion organocatalytique non chiral afin de déterminer l'influence de la protéine sur l'activité et la stéréosélectivité d'un système hybride sur une réaction de condensation d'aldol.²⁸ Dans ce cas, le cation imidazolium biotinylé joue donc un rôle important, non seulement dans la modulation des propriétés stériques et électroniques de l'anion organocatalytique (première sphère de coordination), mais également dans sa position à l'intérieur de la protéine et par conséquent dans la définition de la seconde sphère de coordination.

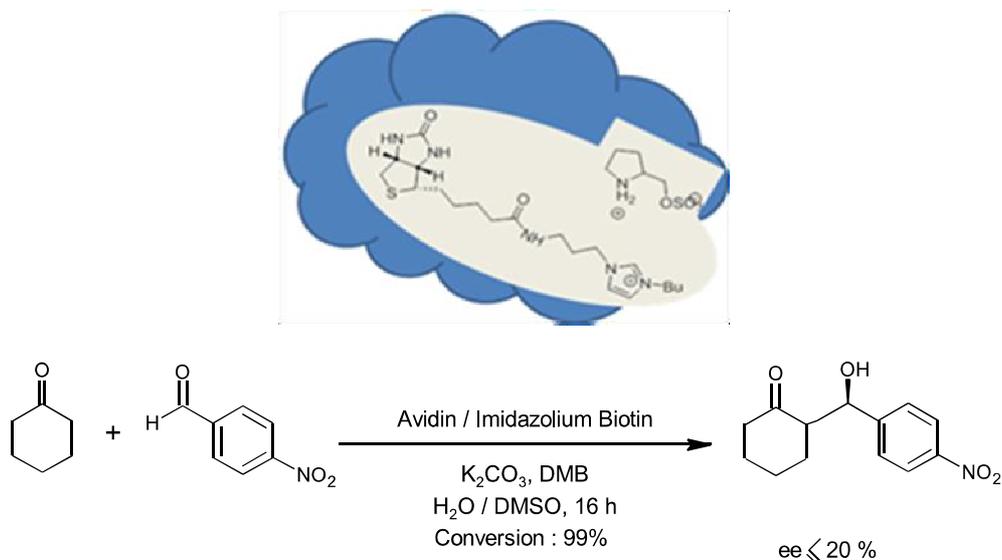


Schéma 55 : Influence de la chiralité de l'anion sur la réaction de condensation d'aldol.

L'utilisation d'un sel d'imidazolium biotinylé en combinaison avec des anions racémiques ou énantiomériquement purs a permis d'étudier le positionnement coopératif et adaptatif du catalyseur anionique à l'intérieur de la protéine (Schéma 55). Les études de dichroïsme circulaire ont révélé l'influence du composé ionique sur la conformation de l'avidine et du catalyseur hybride. Le degré élevé de liberté du catalyseur anionique à l'intérieur de la protéine a été démontré pour différents catalyseurs hybrides et a montré l'influence de la deuxième sphère de coordination fournie par la protéine autour du catalyseur. La présence du cation imidazolium proche du groupe sulfonate favorise l'approche de l'aldéhyde par liaison hydrogène de l'imidazolium à l'atome d'oxygène de l'aldéhyde. Les résultats montrent que le diastéréomère *syn* est le produit principal et la sélectivité dépend de la configuration absolue de l'anion, chaque anion favorisant un énantiomère du produit anti. Cependant, l'excès énantiomérique pour le diastéréomère *anti* est faible (20% ee max.). Il n'y a pas de preuve évidente de concordance et d'incompatibilité dans le cas où l'anion racémique est incorporé dans la protéine, car les deux versions du catalyseur ont conduit à des résultats similaires dans la formation de l'énantiomère anti (S,R), même si la chiralité intrinsèque de l'anion est directement responsable de la stéréosélectivité de la réaction en l'absence d'avidine, il semble que la chiralité à l'intérieur de la protéine gère et améliore la sélectivité du catalyseur hybride. De plus, ceci est l'un des premiers exemples de catalyseur hybride qui est capable de fonctionner dans un milieu liquide ionique avec des conversions de 99% et un ee jusqu'à 28%.

b. Complexes NHC- Métal

Récemment, il a été mis en œuvre un système hybride constitué d'un complexe NHC-rhodium lié de manière covalente à des lipases de type cutinase Antarctica. L'accrochage du complexe à la lipase se fait en utilisant un phosphonate qui se lie de manière covalente et irréversible au résidu sérine son site actif.

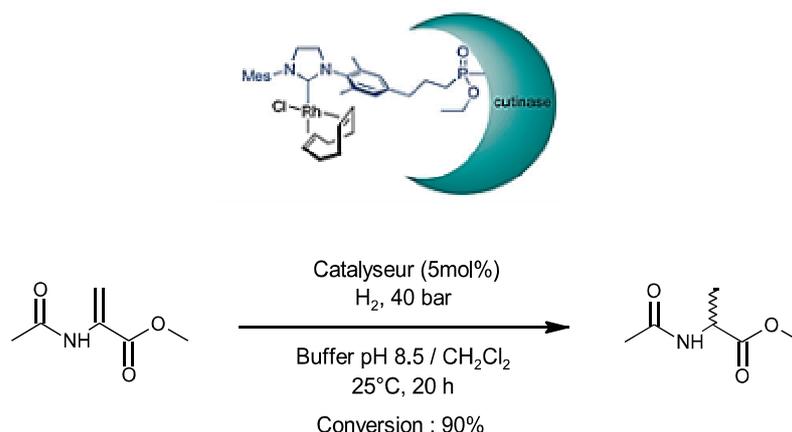


Schéma 56 : Réduction d'oléfine

Les hybrides de lipase catalysent l'hydrogénation du 2-acétamidoacrylate de méthyle avec des rendements excellents et à température ambiante, mais montrent une discrimination induite par la protéine dans l'hydrogénation. Cette chimiosélectivité a été obtenue par l'hybride dérivé de la cutinase dans des temps de réaction plus courts. Alors que d'excellents catalyseurs d'hydrogénation chimiosélective, préférant une réduction de la cétone ou de l'oléfine, ont été développés pour une application en synthèse organique, ces résultats représentent le premier exemple de chimiosélectivité dans les réactions catalysées par des métalloenzymes artificielles. Ces résultats peuvent conduire au développement d'outils catalytiques plus avancés pour la conversion sélective d'un substrat cible dans un mélange complexe de substrats, ce qui intéresse les domaines de la catalyse des systèmes et de la biologie synthétique.²⁹

En 2011, Mayer et al. ont synthétisé un catalyseur de métathèse d'oléfines de type Grubbs-Hoveyda, équipé d'un groupe électrophile bromoacétamide, qui a été utilisé pour modifier un variant de la heat shock protein de *Methanocaldococcus jannaschii* contenant une cystéine.

On a constaté que la métalloenzyme artificielle résultante était active dans des conditions acides dans une réaction de métathèse de fermeture de cycle de référence.

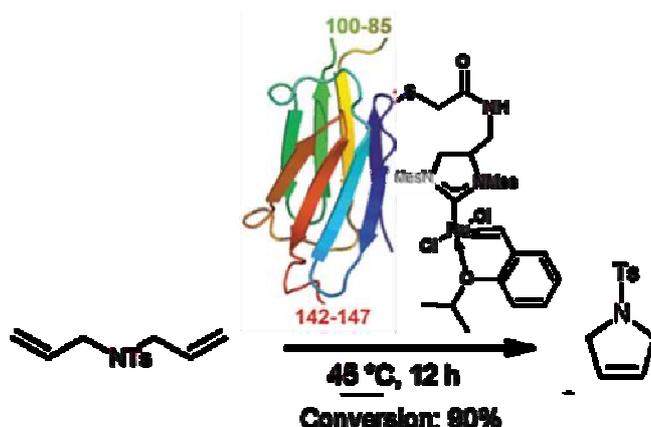


Figure 86 : Réaction de fermeture de cycle par métathèse.

Ces expériences mettent en évidence la faisabilité d'une catalyse de fermeture de cycle par métathèse avec un complexe de ruthénium protéique. Bien que la protéine fournisse une solubilité dans l'eau et empêche l'agrégation, ces catalyseurs hybrides ne sont pas encore pratiques. L'identification de complexes de métathèse plus robustes qui conservent leur activité dans des conditions neutres sera cruciale pour permettre l'exploration d'une gamme plus large d'échafaudages de protéines et pour permettre le réglage fin de la réactivité et la sélectivité de ces métalloenzymes artificiels.³⁰

En 2012, Matsuo et al. ont synthétisé un inhibiteur à base de L-phénylalanine chlorométhylcétone équipé d'un catalyseur de type Hoveyda-Grubbs qui a été incorporé de manière régiosélective dans la cavité de l' α -chymotrypsine par le mécanisme d'inhibition intrinsèque de la protéine pour construire une protéine organométallique artificielle par insertion covalente. Après insertion, la protéine maintient sa structure ordonnée sans dénaturation significative et présente une activité en catalyse de fermeture de cycle par métathèse sur des oléfines hydrosolubles.³¹

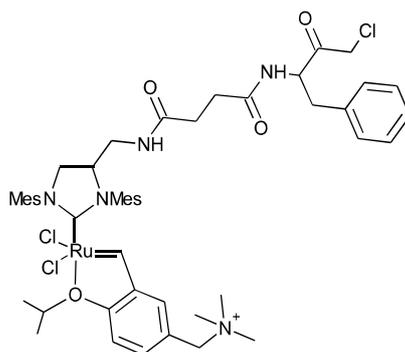


Figure 87 : Catalyseur de de type Hoveyda-Grubbs incorporé dans l' α -chymotrypsine.

Un an plus tard, Philippart et al. ont rapporté la synthèse et l'activité de catalyseurs hybrides composés d'une grande protéine FhuA transmembranaire possédant un β -barrel et d'un seul catalyseur de polymérisation à base de ruthénium résistant à l'eau. Un catalyseur actif en ROMP (« ring-opening metathesis polymerization ») a pu être ancré à une position prédéfinie dans la protéine et utilisé avec succès dans la polymérisation d'un monomère dérivé du 7-oxanorbornène. Un nouveau variant de FhuA avec deux sites de clivage par la protéase de TEV (virus de la gravure du tabac) et une seule cystéine en position 545 a été conçu.

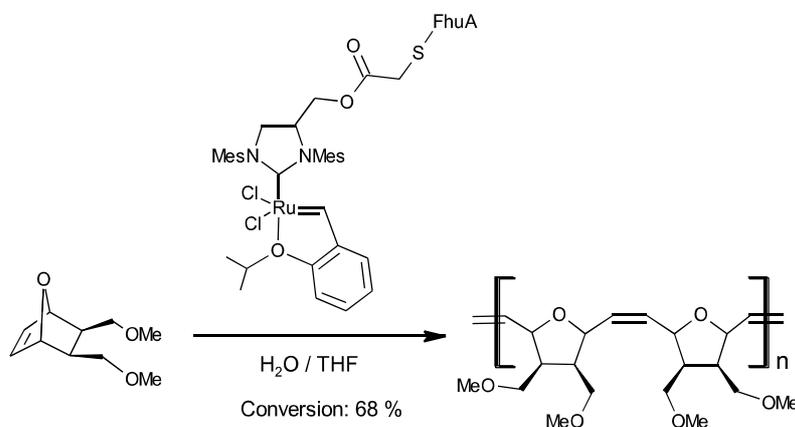


Schéma 57 : Polymérisation par ouverture de cycle

De plus, une voie synthétique de deux catalyseurs de type Grubbs-Hoveyda stables dans l'eau avec des unités de liaison divergentes a été développée et couplée avec succès à la cystéine libre de FhuA Δ CVF^{tev}. Le catalyseur hybride Grubbs-Hoveyda-FhuA Δ CVF^{tev} lié de manière covalente a été caractérisé par diverses techniques analytiques et son utilisation a été validée en catalyse de ROMP. La stratégie de liaison par un maléimide a fourni les meilleurs résultats

pour le couplage d'un composé organométallique à la protéine dans les milieux aqueux. Les catalyseurs hybrides montrent des conversions élevées, mais jusqu'à présent, seul un léger effet de sélectivité a été observé.³²

Par la suite, Sauer et al. ont synthétisé un catalyseur hybride de ROMP basé sur la même protéine à β -barrel FhuA Δ CVFt^{cv}, qui a été modifiée pour permettre l'ancrage du catalyseur de type Grubbs-Hoveyda par liaison covalente. Le raccourcissement de l'espaceur (1,3-propanediyle en méthylène) entre le ligand de carbène N-hétérocyclique et le site de la Cys545 a augmenté l'activité ROMP sur le dérivé hydrosoluble 7-oxanorbornène. Le rapport *cis* / *trans* des doubles liaisons dans le polymère a été influencé par le catalyseur hybride.

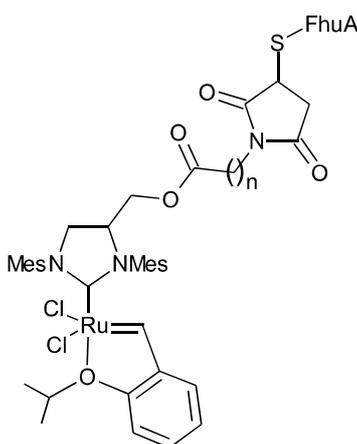


Figure 88 : Métalloenzyme artificielle pour la ROMP

Il a été étudié l'influence de la longueur de l'espaceur sur l'activité et la sélectivité du catalyseur hybride constitué par la protéine FhuA Δ CVFt^{tev} et un catalyseur de type Grubbs-Hoveyda. En raccourcissant la longueur du bras, il était possible d'augmenter l'activité (TON). De plus, il a été observé une teneur en doubles liaisons *cis* légèrement augmentée dans les polymères synthétisés avec les catalyseurs hybrides. Par rapport aux catalyseurs hydrosolubles, il a été observé une variation significative du rapport *cis* / *trans* (augmentation de la teneur en *cis* de 50% (catalyseurs hydrosolubles) à 58% (catalyseur hybride)).³³

Des complexes de type Grubbs-Hoveyda avec des bras de différentes longueurs ont été ancrés par liaison covalente à deux variants de la nitrobindine (NB). La combinaison du mutant NB avec une cavité relativement grande et du complexe a abouti à un catalyseur hautement actif pour les réactions de fermeture de cycle par métathèse et polymérisation par métathèse dans

de l'eau dans des conditions relativement douces (pH 6, T = 25 - 40 °C) sans co-solvant organique. Grâce à la cavité protéique hydrophobe, les catalyseurs de type Grubbs-Hoveyda sont devenus hydrosolubles et la catalyse peut être effectuée dans l'eau.³⁴

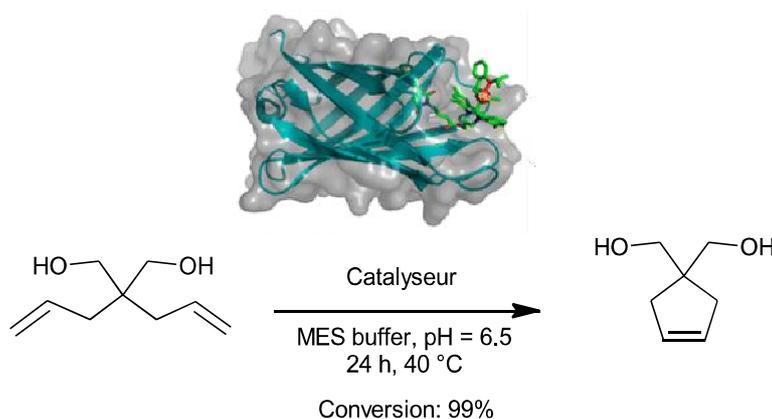


Schéma 58 : Fermeture de cycle par métathèse en présence d'une métalloenzyme de ruthénium-NHC.

Une série de catalyseurs de type Grubbs contenant des fonctionnalités phosphoester inhibant la lipase ont été synthétisées par Basauri-Molina et al. Ces catalyseurs ont réagi avec la lipase cutinase, ce qui conduit à des métalloenzymes artificielles pour la métathèse d'oléfines. Les hybrides résultants comprennent le fragment organométallique qui est lié de manière covalente à l'acide aminé du site actif de l'enzyme hôte dans une orientation orthogonale. Les différences de réactivité ainsi que l'accessibilité du site actif par l'inhibiteur fonctionnalisé sont devenues évidentes grâce à la variation du motif d'ancrage et des substituants sur le ligand carbène N-hétérocyclique. De telles observations ont conduit à la conception d'hybrides actifs pour la métathèse de fermeture de cycle et la métathèse croisée du N, N-diallyl-p-toluènesulfonamide et de l'allylbenzène, respectivement, ce dernier étant le premier exemple de son genre dans le domaine des métalloenzymes artificielles.

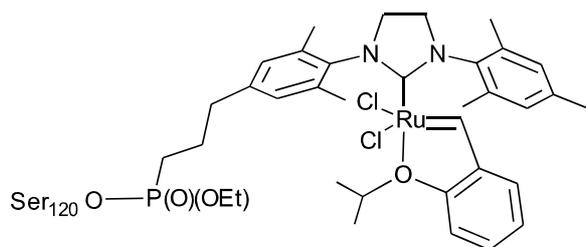


Figure 89 : Catalyseur inséré dans la lipase cutinase,

Après l'inhibition covalente de la cutinase avec des inhibiteurs de phosphate de Ru-(NHC), les hybrides formés peuvent être purifiés par dialyse et conservent leur caractère covalent même après la dénaturation, comme le montre la spectrométrie de masse.²⁹

Enfin l'équipe de Ward a réalisé l'incorporation d'un catalyseur de Hoveyda-Grubbs biotinylé dans la streptavidine afin de concevoir une métalloenzyme basée sur une approche supramoléculaire, capable de réaliser la fermeture de cycle par métathèse de N-tosyl diallylamine en milieu aqueux. De plus, l'utilisation de différents bras espaceurs a permis d'augmenter les résultats des catalyseurs hybrides et d'obtenir des conversions jusqu'à 95%.³⁵

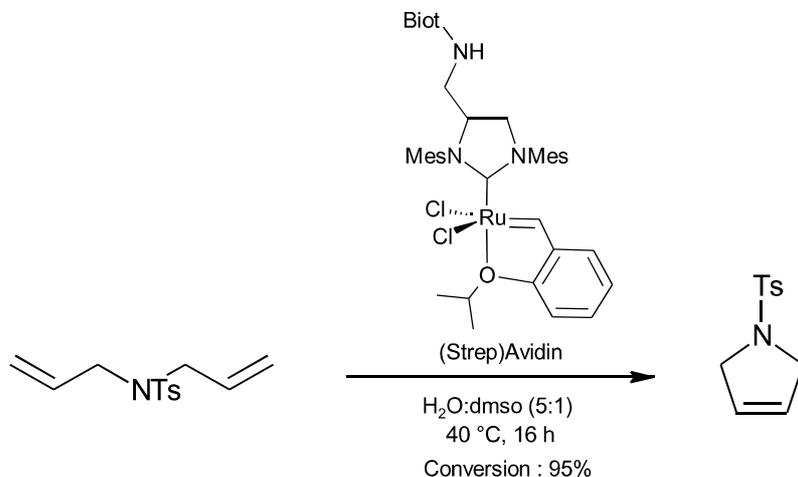


Schéma 59 : Réaction de fermeture de cycle par métathèse en présence de complexe biotinylé associé à la streptavidine.

II. Projet

La chimie de l'or est une chimie très développée et très riche permettant d'accéder à un grand nombre de réactions différentes, qui pour certaines ont été adaptée au milieu aqueux. Ces premières caractéristiques montrent un premier avantage à l'utilisation de ces complexes

NHC-Au en association avec des bio-macromolécules hôtes car ils permettraient d'avoir accès à de nouvelles réactions pour certaines déjà adaptées au milieu aqueux, la présence de la biomolécule pourrait apporter un véritable gain au niveau de la solubilité des complexes NHC-Au, ainsi qu'à la formation de ArMs innovantes, car l'exception de la publication de Lee et Zhao ³⁶, où est reportée la création d'une métalloenzyme artificielle formée d'une micelle inverse dans laquelle sont encapsulés des dérivés d'or(III), il n'existe aucun modèle de ArM-Au et aucun ArM-NHC-Au. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ces complexes pour la catalyse avec des métalloenzymes.

Dans cette approche, on retrouvera la volonté de fonctionnaliser avec différentes longueurs de chaînes aliphatiques de manière à pouvoir réaliser l'insertion supramoléculaire des ligands et des complexes dans la β -Lg. Cependant, dans le cas des complexes NHCs d'or seule la seconde sphère de coordination de la protéine sera utilisée pour induire la sélectivité. En effet, dans ce chapitre aucune hémilabilité ne sera mise en place contrairement aux chapitres précédents avec le palladium et le ruthénium.

Dans ce projet, nous nous sommes concentrés principalement sur des complexes NHC-Au très peu encombrés afin d'éviter des problèmes d'insertion éventuels dans la β -Lg, comme cela a pu être le cas avec certains complexes de palladium présentés au deuxième chapitre.

Pour cela, nous nous sommes intéressée à l'utilisation d'imidazole comme précurseur afin d'introduire le complexe d'or. Nous avons envisagé de fonctionnaliser le composé de manière à obtenir des ligands bifonctionnels comportant d'une part un motif permettant de se lier avec la protéine par des liaisons supramoléculaires et d'autre part un site permettant la complexation de l'or. Ce type de ligand pourrait par la suite être testé dans des réactions asymétriques en présence de β -lactoglobuline. Les imidazoles avec des groupes méthyles étant peu encombrants, l'insertion dans la β -Lg pourrait facilitée.

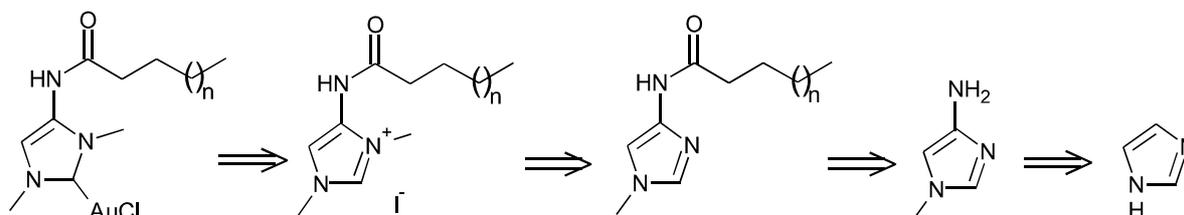


Figure 90 : Rétrosynthèse à partir de l'imidazole.

III. Synthèse de dérivés Imidazole

La première étape de cette synthèse consiste en une nitration régiosélective en position 5 de l'imidazole **37**, en utilisant un mélange d'acide nitrique et d'acide sulfurique afin de conduire au composé **38**.³⁷

Ce dernier **38** est alors soumis à une méthylation en présence d'iodure de méthyle et de carbonate de potassium afin d'obtenir le composé **39** avec un rendement de 70%.³⁸ Une réduction du groupement nitro par du dihydrogène en présence de palladium sur charbon comme catalyseur permet d'obtenir le composé **40** avec un rendement de 99 %. La réaction de méthylation est réalisée avant la réduction afin de faciliter la transformation du groupement nitro en amine. En effet, la réduction du composé **39** en **40** s'effectue sous atmosphère d'hydrogène, alors que, si l'on effectue la réduction du composé **38** il faudra se mettre dans des conditions de réduction plus fortes et notamment en mettant sous pression d'hydrogène le composé **38**.

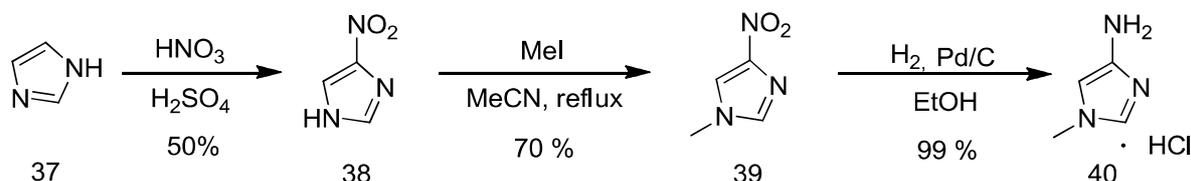
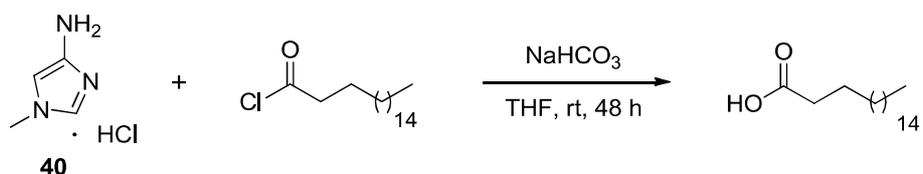


Schéma 60: Formation du composé **40** à partir de l'imidazole **37**.

Une fois le chlorhydrate d'imidazole **40** obtenu, plusieurs tests ont été réalisés pour fonctionnaliser l'amine en amide. Dans un premier temps, le chlorure d'acide a été utilisé en présence de différentes bases comme l'hydrogénocarbonate de sodium et la triéthylamine. Cependant, ces réactions ne permettent pas d'obtenir le produit **41** voulu seulement de former l'acide palmitique correspondant et une dégradation du composé **40**.

Tableau 17 : Fonctionnalisation de l'amine **40** par le chlorure d'acide en fonction de différentes conditions.



Base	Condition	Solvant
NaHCO ₃	48 h r.t	THF
NEt ₃	16 h reflux	Ethanol

Afin d'éviter la formation de l'acide, nous avons décidé de réaliser le couplage entre l'acide palmitique et le composé **40** en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et d'hydroxybenzotriazole (HOBt). Cependant après 48 h, la réaction ne permet pas d'obtenir le composé voulu et les réactifs de départ sont retrouvés à l'exception du composé **40** qui s'est une nouvelle fois dégradé en solution.

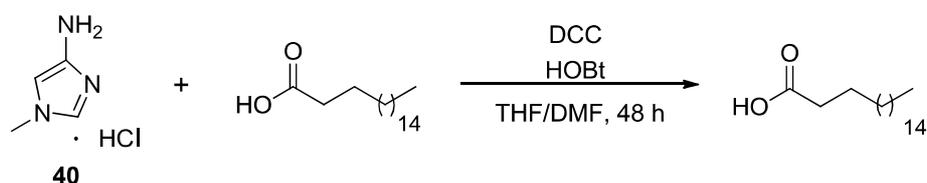


Figure 91 : Réaction de couplage entre 40 et l'acide palmitique en présence de DCC.

Suite à ces résultats, une réaction est envisagée mettant en jeu le composé **40** en présence du composé **42** et de triéthylamine. Cette réaction donne le composé voulu **41-s** avec un rendement de 10% au bout de 48 h. Nous avons alors émis l'hypothèse que la base utilisée (la triéthylamine) n'était peut-être pas assez forte et l'avons remplacé par le carbonate de potassium.

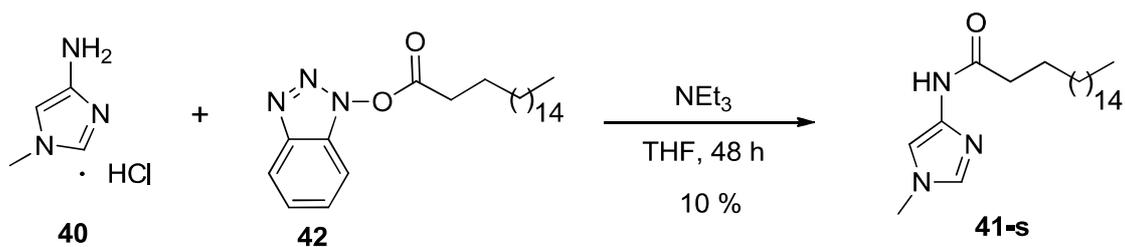


Schéma 61 : Formation du produit 41-s.

En effet, lorsque les composés **40** et **42** ont été mis en présence de carbonate de potassium, un meilleur rendement a été observé et dans un temps plus court. Néanmoins il a aussi observé que même si on laissait la réaction pendant 48 h on retrouvait le même rendement de 25-35%, le sel d'imidazole semble très peu stable en solution ce qui explique le faible rendement.

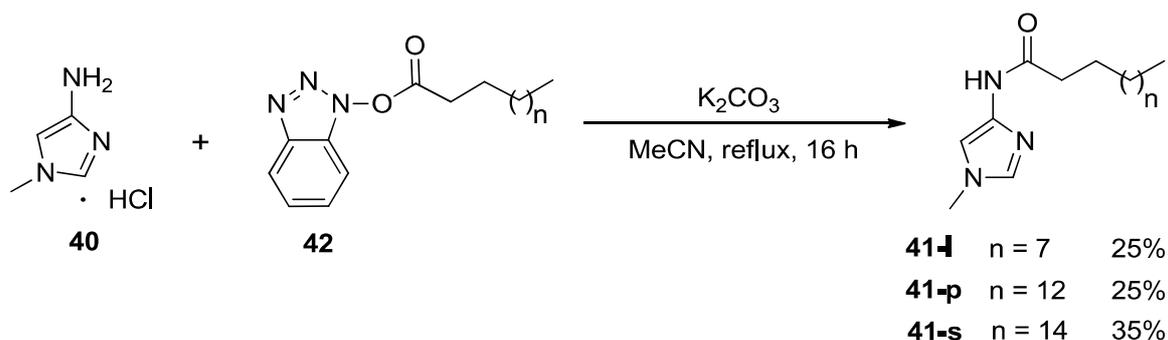


Schéma 62 : formation des produits 41-l, 41-p, 41-s.

IV. Préparation des complexes

Une fois les molécules **41** obtenues, la synthèse des ions imidazolium **43** est réalisée par réaction de l'iodométhane afin de former les composés **43** avec un rendement de 28-30% en fonction de la longueur de la chaîne. Lors de la formation de l'ion imidazolium **43-l**, un déblindage est observé de 0,2 ppm du proton H_a de même le carbone portant ce proton subit un déblindage de 5 ppm.

Ces derniers ont ensuite été transformés en complexes d'or, pour ce faire une réaction one pot est réalisée. En effet, le complexe d'argent est d'abord synthétisé comme intermédiaire avec l'oxyde d'argent puis après 10h à température ambiante, le chloro(diméthylsulfure)Au(I) est directement ajouté à la réaction et celle-ci est alors laissée 16 h supplémentaires pour permettre

d'obtenir les complexes d'or **44** avec des rendements de 20 – 50% en fonction des longueurs de chaînes. La RMN ^1H des composés **44** montre la disparition du proton H_a . De plus, le carbone qui devenu quaternaire subit un déblindage de 2 ppm.

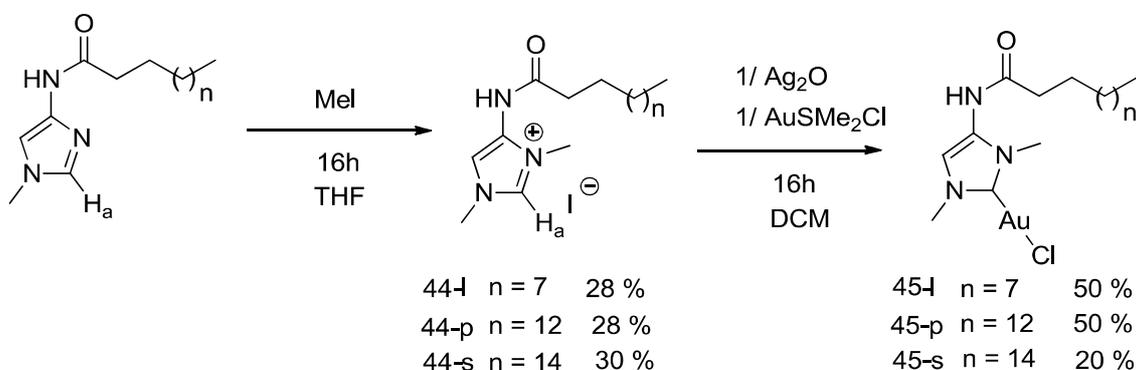


Schéma 63 : Formation des complexes NHC-or à partir de des ions imidazolium.

V. Insertion dans la protéine par CD dans le proche uv

La première analyse réalisée pour vérifier l'insertion des ligands et des complexes dans la protéine est le dichroïsme circulaire (CD). Le CD correspond à une étude d'absorption UV qui apparaît pour toute molécule optiquement active ou placée dans un environnement asymétrique, car le chromophore va absorber différemment la lumière polarisée circulairement droite et gauche, et c'est cette différence d'absorption qui va donner le spectre CD. L'insertion d'un chromophore dans la β -Lg peut induire un changement au niveau du spectre CD causé par la présence du chromophore dans l'environnement chiral de la protéine (effet extrinsèque) ou par perturbation de l'environnement du résidu aromatique (effet intrinsèque).

Le spectre de dichroïsme circulaire de la β -Lg, en UV-proche, permet de caractériser la structure tertiaire de la protéine. En raison principalement des contraintes asymétriques de l'environnement des acides aminés. Pour la β -Lg native en milieu aqueux la zone étudiée va de 400 à 250 nm. Dans cette zone, le spectre CD en proche UV de la β -LG affiche un motif de deux bandes négatives qui est attribué à ses résidus aromatiques, la première bande à 293 et la deuxième à 285 nm³⁹. Ces deux pics sont dus majoritairement à l'absorbance des tryptophanes (Trp 19 et 61). La liaison d'un chromophore à la β -LG peut induire un changement du spectre CD causé par l'effet extrinsèque ou intrinsèque. Lors de l'insertion du

chromophore dans la protéine, le ligand va changer d'environnement et si celui-ci est assez fort, il devrait y avoir un transfert de chiralité et donc un changement possible dans le spectre CD.



Figure 92 : Association entre la protéine et le ligand par CD

Malheureusement, lors de premières mesures avec tous les imidazolium, aucun changement n'est observé après ajout d'un équivalent dans une solution de β -Lg à pH = 7.5. Les spectres de CD des mélanges de β -Lg et des ligands (**43-s**, **43-p** et **43-l**) sont réalisés sans problème de solubilité car après ajout des solutions des ligands dans le méthanol, aucun précipité n'est observé (Figure 25). Cependant, comme les ligands ne présentent aucune absorbance dans la zone spectrale (250 – 330 nm), seul un effet intrinsèque pourrait être observé. Comme aucune modification des spectres n'est observée, on peut en conclure que la perturbation de l'environnement des résidus aromatiques de la protéine n'est pas assez important pour exprimer un changement au niveau du spectre CD.

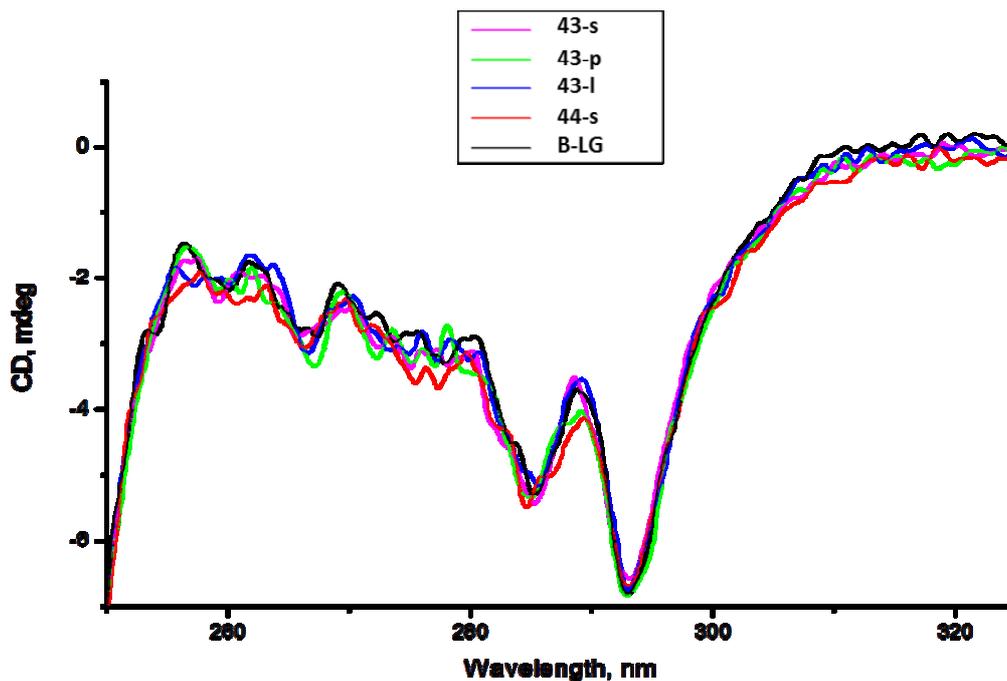


Figure 93 : Spectres CD de la β -Lg et des mélanges de β -Lg + 43-s, 43-p, 43-l et 44-s.

La même expérience a été réalisée avec les complexes d'or correspondants (**44-s**, **44-p** et **44-l**), eux aussi se trouvent être solubles après ajout à la solution tamponnée de protéine. Cependant, contrairement aux ligands, les complexes possèdent une faible absorbance entre 260 et 280 nm, un effet extrinsèque peut être envisagé. Néanmoins après ajout des complexes **44-l**, **44-s** ou **44-p** aucun changement du spectre CD n'a été observé, on retrouve le même spectre que pour la β -Lg seule. Néanmoins, cela ne signifie pas que les ligands ou les complexes ne s'insèrent pas dans la protéine. Mais seulement qu'aucun des deux effets cités précédemment ne semble être suffisamment prononcé pour induire un changement au niveau du spectre CD.

Par conséquent, une expérience de compétition par déplacement a été réalisée comme suit. Le spectre CD de la β -Lg a été mesuré en premier, puis le spectre CD d'un mélange stœchiométrique de β -Lg et de N, N-dipyridin-2-hexadécanamide (**Réf**) dont l'insertion dans la cavité de la β -Lg est connue et a été préalablement affirmée par spectroscopie CD a été enregistrée. Une large bande positive centrée à 270 nm a été observée sur le spectre CD du mélange de β -Lg et **Réf**. Après addition d'une quantité stœchiométrique de **43-l**, **43-s** ou **43-p**, l'intensité de la bande positive a diminué de manière significative. Cela est dû au déplacement partiel du ligand **Réf** de la cavité de la β -Lg par **43-l**, **43-s** et **43-p**. De la même manière, pour

les complexes **44-l**, **44-s** et **44-p** l'intensité de la bande positive a diminué de manière significative. Ainsi, la spectroscopie CD proche de l'UV a fourni une preuve indirecte et qualitative de la capacité des imidazolium **43-l**, **43-s** et **43-p**, et des complexes NHC-Au, **44-l**, **44-s** et **44-p** à se lier à la β -Lg par insertion probable dans la poche hydrophobe de la protéine (Figure 27).

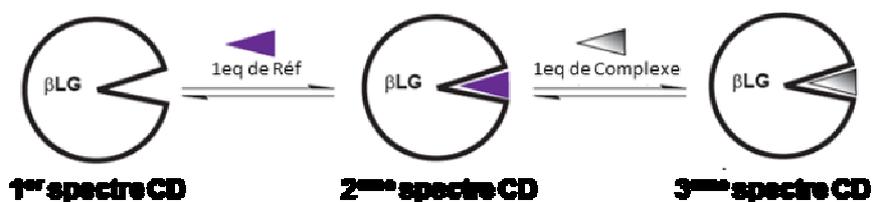


Figure 94 : Association entre la protéine et le ligand par déplacement du ligand de référence.

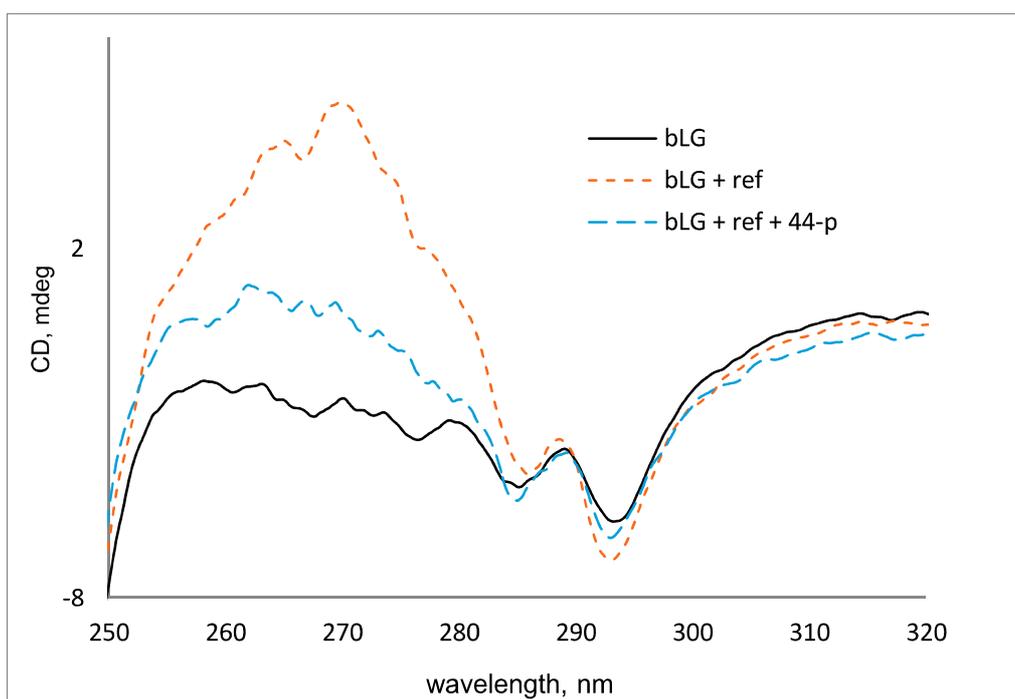


Figure 95 : Spectre CD de la β -Lg, du mélange de β -Lg + Réf et du mélange β -Lg + Réf + 44-p.

VI. Tests catalytiques

a. Complexe d'or

Afin de vérifier le pouvoir catalytique des complexes NHC-Au, une réaction de cyclisation intramoléculaire a été envisagée. En effet, même si une des réactions les plus développées avec les complexes NHC est l'hydratation, il fallait donc pouvoir trouver une réaction capable d'être catalysée dans l'eau tout en induisant la formation d'un centre stéréogène. C'est pourquoi nous avons décidé de nous intéresser à la cyclisation intramoléculaire avec formation d'un centre asymétrique de manière à pouvoir connaître l'influence de la seconde sphère de coordination de la β -Lg sur la sélectivité de la réaction.

L'étude de la réactivité sur la 1,6-enyne **51** a alors été envisagée, par analogie avec la littérature, car celle-ci permettait à la fois la réalisation d'une cyclisation tout en introduisant la formation d'un centre stéréogène dans l'eau.⁴⁰

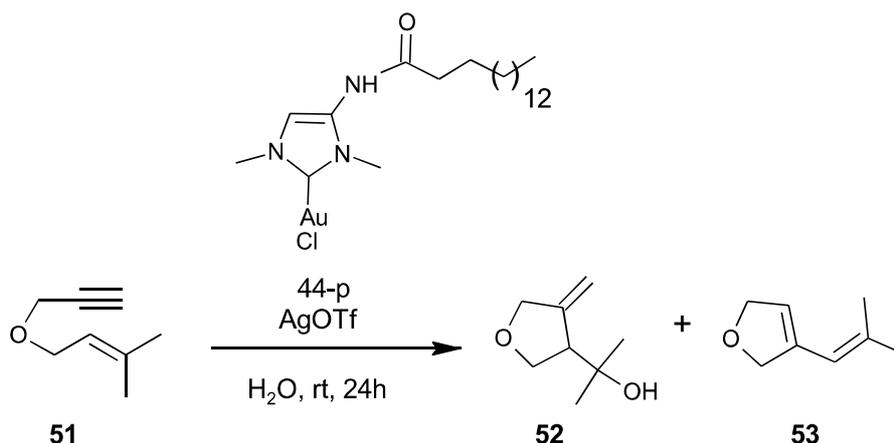


Schéma 64 : Réaction de cyclisation de **51** catalysée par **44-p**

Afin de connaître l'activité du complexe **44-p**, différents tests ont été réalisés. Un premier test a été mis en place dans des conditions proches de la publication de Hart-Cooper et al.⁴⁰ Pour cela, 10 mol% de complexe est mis en présence de composé **51** et d'AgOTf 20 mol%. Malheureusement le produit désiré n'est pas obtenu et seul le produit de départ est retrouvé après 24 h de réaction dans l'eau. Le manque de réactivité du complexe **44-p** peut être associé à la dimérisation possible des complexes d'or.

Malgré tout, il a été décidé de réaliser la réaction en milieu aqueux en présence de β -Lg. Pour cela le complexe **44-p** est mis en présence de β -Lg et laissé sous agitation pendant 1 h puis le

composé **51** est ajouté pour réaliser la cyclisation. Néanmoins même dans ce cas, aucune formation du produit **52** n'a pu être observée. De la même manière que précédemment, le composé **51** est retrouvé.

Une hypothèse à l'absence de réactivité du complexe **44-p** serait le complexe dimérique d'or, qui se ferait même en présence de la β -Lg (Figure 96), en effet, les complexes sont très peu encombrés par la présence des deux méthyles, il est alors possible qu'après la formation du complexe cationique d'or en présence d'eau et / ou d' Ag^+ , on ait la formation d'un complexe dimérique.⁴¹

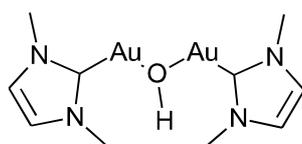


Figure 96 : Complexe NHC-Au dimérique.

b. Imidazolium

Comme la catalyse avec les complexes NHC-Au n'a pas fonctionné, il a ensuite été considéré des réactions de catalyse avec les imidazoliums. En effet, il a été démontré qu'il était possible de réaliser la condensation entre l'allylaldéhyde **53** et l'allylcétone **54** pour former un composé cyclique **55** tout en créant trois nouveaux centres asymétriques en une étape. Ces travaux récemment publiés par Chi et al. ont montré les couplages entre cétones et aldéhydes catalysés par un imidazolium dans l'eau en présence de base.⁴²

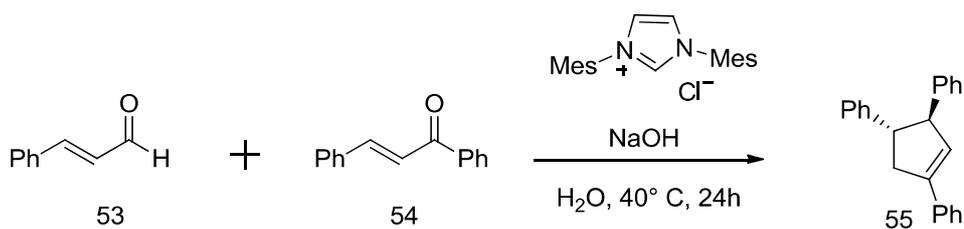


Schéma 65 : Condensation d'allylaldéhyde **53** et allylcétone **54** en présence d'imidazolium.

Pour cela, la réaction est accomplie dans l'eau comme solvant à 40 °C en présence de 5 mol% de précurseur de NHC, et 2 équivalents de NaOH comme base. La réaction est très diastéréosélective, et le produit **55** a été obtenu avec des rendements allant jusqu'à 70%.

Lorsque la réaction est effectuée dans D₂O, le deutérium se retrouve en trois positions sur le produit à différents emplacements, mettant en évidence le rôle actif de l'eau dans cette réaction.

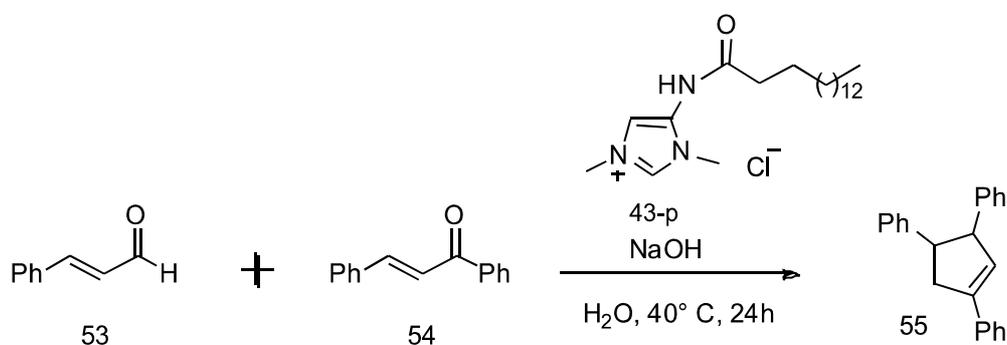


Schéma 66 : Condensation d'allyldéhyde 53 et allylcétone 54 en présence de 43-p

Au vu des résultats de la publication, cette réaction de condensation a été tentée cette fois avec **43-p**. Cependant un premier test réalisé en présence de 10 mol% de **43-p** sans β-LG n'a montré aucune évolution de la réaction après 24 h, seuls les produits de départ **53** et **54** sont retrouvés. Le composé **43-p** semble n'avoir aucune activité sur la réaction. Cependant cet imidazolium étant peu encombré il est possible qu'après l'ajout de soude, il y ait la dimérisation du NHC. Avec les NHCs libres les orbitales σ des deux NHCs peuvent combler les orbitales Pπ de leur homologue suivant l'équilibre de Wanzlick. L'addition de groupements encombrants sur les azotes les protège cinétiquement de cette réaction de dimérisation et augmente leur durée de vie en solution. Mais cette protection stérique n'est pas un facteur décisif puisque des NHCs peu encombrés ont déjà été isolés.

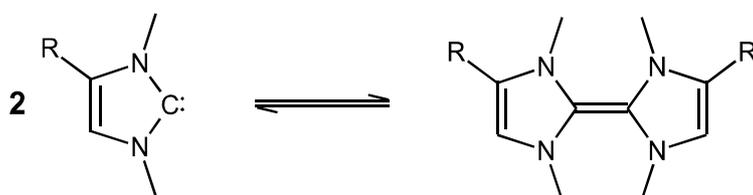


Figure 97 : Equilibre de Wanzlick

C'est pourquoi nous avons aussi réalisé la déprotonation après avoir incubé **44-p** avec la β -LG pendant 1 h afin de favoriser son insertion dans la protéine, seulement après la soude est ajoutée pour réaliser la déprotonation de l'imidazolium. Cependant même avec la protéine nous n'observons pas la formation du composé voulu seulement les produits de départ. Ce qui laisse envisager que malgré la β -Lg, on ait une dimérisation des NHCs, il est possible que l'insertion ne soit pas totale dans la protéine laissant une partie de l'imidazolium à l'extérieur pouvant réagir avec le NHC inséré dans la protéine.

VII. Conclusion

Nous avons synthétisé des dérivés imidazolium comportant le motif intercalant avec différentes longueurs de chaînes (C12 à C18). Ces ligands ont ensuite permis de synthétiser les complexes d'or-NHC correspondants. L'insertion dans la β -Lg a été déterminée par des expériences de dichroïsme circulaire. Enfin des premiers tests catalytiques ont été réalisés et laisse supposer qu'un encombrement plus important des NHCs était nécessaire. En effet, la présence de substituants méthyl est susceptible de favoriser la dimérisation ce qui abolit le pouvoir catalytique des complexes.

De plus, les complexes ne semblent pas suffisamment stabilisés dans la protéine pour éviter la dimérisation du carbène en présence de β -Lg. Pour cela des ligands NHCs fonctionnalisés par des substituants comportant des groupements hydroxy pouvant réaliser des liaisons hydrogènes avec la protéine sont à envisager (Figure 98). Ces NHCs devraient être plus stables une fois insérés dans la protéine ainsi lors de la formation du carbène, la dimérisation devrait être évitée grâce à l'encombrement apporté par la β -Lg.

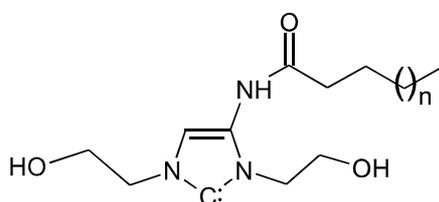


Figure 98 : Dérivé NHC avec groupements hydroxy pouvant générer des liaisons hydrogènes supplémentaires.

En même temps, il pourrait être envisagé de synthétiser des complexes de NHC légèrement plus encombrés, de type complexe à pinces comme le montre la Figure 99. Avec ces complexes il serait alors possible d'ajouter le principe d'hémilabilité en substituant le complexe d'or par le palladium. De plus dans le cas des NHCs il est possible d'introduire deux substituants différents sur les azotes et ainsi ne plus avoir de complexe symétrique.

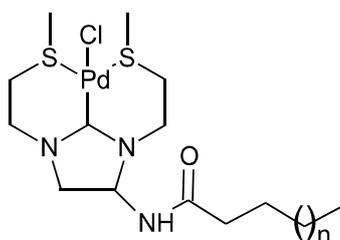


Figure 99 : Complexe NHC-Palladium à pince

VIII. Bibliographie

- (1) Wanzlick, H.-W.; Schönherr, H.-J. Direct Synthesis of a Mercury Salt-Carbene Complex. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, *7* (2), 141–142.
- (2) Arduengo, A. J.; Harlow, R. L.; Kline, M. A Stable Crystalline Carbene. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (1), 361–363.
- (3) Schuster, O.; Yang, L.; Raubenheimer, H. G.; Albrecht, M. Beyond Conventional N-Heterocyclic Carbenes: Abnormal, Remote, and Other Classes of NHC Ligands with Reduced Heteroatom Stabilization. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (8), 3445–3478.
- (4) Melaimi, M.; Soleilhavoup, M.; Bertrand, G. Stable Cyclic Carbenes and Related Species beyond Diaminocarbenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (47), 8810–8849.
- (5) Crabtree, R. H. Abnormal, Mesoionic and Remote N-Heterocyclic Carbene Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257* (3), 755–766.
- (6) Arnold, P. L.; Pearson, S. Abnormal N-Heterocyclic Carbenes. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251* (5), 596–609.
- (7) Breslow, R. On the Mechanism of Thiamine Action. IV.1 Evidence from Studies on Model Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (14), 3719–3726.
- (8) Shaughnessy, K. H. Hydrophilic Ligands and Their Application in Aqueous-Phase Metal-Catalyzed Reactions. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (2), 643–710.
- (9) Bierenstiel, M.; Cross, E. D. Sulfur-Functionalized N-Heterocyclic Carbenes and Their Transition Metal Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255* (5), 574–590.
- (10) Kascatan-Nebioglu, A.; Panzner, M. J.; Tessier, C. A.; Cannon, C. L.; Youngs, W. J. N-Heterocyclic Carbene–silver Complexes: A New Class of Antibiotics. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251* (5), 884–895.
- (11) Sundberg, R. J.; Bryan, R. F.; Taylor, I. F.; Taube, H. Nitrogen-Bound and Carbon-Bound Imidazole Complexes of Ruthenium Ammines. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96* (2), 381–392.
- (12) Velazquez, H. D.; Verpoort, F. N-Heterocyclic Carbene Transition Metal Complexes for Catalysis in Aqueous Media. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (21), 7032–7060.
- (13) Schaper, L.-A.; Hock, S. J.; Herrmann, W. A.; Kühn, F. E. Synthesis and Application of Water-Soluble NHC Transition-Metal Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52* (1), 270–289.
- (14) Díez-González, S.; Nolan, S. P. Stereoelectronic Parameters Associated with N-Heterocyclic Carbene (NHC) Ligands: A Quest for Understanding. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251* (5), 874–883.
- (15) Bourissou, D.; Guerret, O.; Gabbai, F. P.; Bertrand, G. Stable Carbenes. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (1), 39–92.
- (16) Herrmann, W. A.; Köcher, C. N-Heterocyclic Carbenes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36* (20), 2162–2187.
- (17) Boehme, C.; Frenking, G. N-Heterocyclic Carbene, Silylene, and Germylene Complexes of MCl (M = Cu, Ag, Au). A Theoretical Study I. *Organometallics* **1998**, *17* (26), 5801–5809.
- (18) Jacobsen, H.; Correa, A.; Costabile, C.; Cavallo, L. π -Acidity and π -Basicity of N-Heterocyclic Carbene Ligands. A Computational Assessment. *J. Organomet. Chem.* **2006**, *691* (21), 4350–4358.
- (19) Dorta, R.; Stevens, E. D.; Scott, N. M.; Costabile, C.; Cavallo, L.; Hoff, C. D.; Nolan, S. P. Steric and Electronic Properties of N-Heterocyclic Carbenes (NHC): A Detailed Study on Their Interaction with Ni(CO)₄. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (8), 2485–2495.

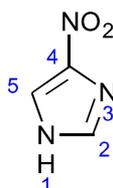
- (20) Hashmi, A. S. K. Gold-Catalyzed Organic Reactions. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (7), 3180–3211.
- (21) Ponomarev, D. A.; Shevchenko, S. M. Hydration of Acetylene: A 125th Anniversary. *J. Chem. Educ.* **2007**, *84* (10), 1725.
- (22) Schneider, S. K.; Herrmann, W. A.; Herdtweck, E. Synthesis of the First Gold(I) Carbene Complex with a Gold-Oxygen Bond — First Catalytic Application of Gold(I) Complexes Bearing N-Heterocyclic Carbenes. *Z. Für Anorg. Allg. Chem.* **2003**, *629* (12–13), 2363–2370.
- (23) Zhang, Z.; Du Lee, S.; Fisher, A. S.; Widenhofer, R. A. Gold(I)-Catalyzed Hydration of Allenes. *Tetrahedron* **2009**, *65* (9), 1794–1798.
- (24) Bender, C. F.; Widenhofer, R. A. Room Temperature Hydroamination of N-Alkenyl Ureas Catalyzed by a Gold(I) N-Heterocyclic Carbene Complex. *Org. Lett.* **2006**, *8* (23), 5303–5305.
- (25) Nun, P.; Dupuy, S.; Gaillard, S.; Poater, A.; Cavallo, L.; P. Nolan, S. Gold(i) - Catalyzed Synthesis of Furans and Pyrroles via Alkyne Hydration. *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1* (1), 58–61.
- (26) Li, L.; Shu, C.; Zhou, B.; Yu, Y.-F.; Xiao, X.-Y.; Ye, L.-W. Generation of Gold Carbenes in Water: Efficient Intermolecular Trapping of the α -Oxo Gold Carbenoids by Indoles and Anilines. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (10), 4057–4064.
- (27) Shen, C.-H.; Li, L.; Zhang, W.; Liu, S.; Shu, C.; Xie, Y.-E.; Yu, Y.-F.; Ye, L.-W. Gold-Catalyzed Tandem Cycloisomerization/Functionalization of in Situ Generated α -Oxo Gold Carbenes in Water. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (19), 9313–9318.
- (28) Gauchot, V.; Branca, M.; Schmitzer, A. Encapsulation of a Catalytic Imidazolium Salt into Avidin: Towards the Development of a Biohybrid Catalyst Active in Ionic Liquids. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20* (6), 1530–1538.
- (29) Basauri-Molina, M.; F. Riemersma, C.; A. Würdemann, M.; Kleijn, H.; Gebbink, R. J. M. K. Lipase Active Site Covalent Anchoring of Rh(NHC) Catalysts: Towards Chemoselective Artificial Metalloenzymes. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (31), 6792–6795.
- (30) Mayer, C.; Gillingham, D. G.; Ward, T. R.; Hilvert, D. An Artificial Metalloenzyme for Olefin Metathesis. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (44), 12068.
- (31) Matsuo, T.; Imai, C.; Yoshida, T.; Saito, T.; Hayashi, T.; Hirota, S. Creation of an Artificial Metalloprotein with a Hoveyda-Grubbs Catalyst Moiety through the Intrinsic Inhibition Mechanism of α -Chymotrypsin. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2012**, *48* (11), 1662–1664.
- (32) Philippart, F.; Arlt, M.; Gotzen, S.; Tenne, S.-J.; Bocola, M.; Chen, H.-H.; Zhu, L.; Schwaneberg, U.; Okuda, J. A Hybrid Ring-Opening Metathesis Polymerization Catalyst Based on an Engineered Variant of the β -Barrel Protein FhuA. *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19* (41), 13865–13871.
- (33) Sauer, D. F.; Bocola, M.; Broglia, C.; Arlt, M.; Zhu, L.-L.; Brocker, M.; Schwaneberg, U.; Okuda, J. Hybrid Ruthenium ROMP Catalysts Based on an Engineered Variant of β -Barrel Protein FhuA Δ CVFtev: Effect of Spacer Length. *Chem. – Asian J.* **2015**, *10* (1), 177–182.
- (34) Sauer, D. F.; Himiyama, T.; Tachikawa, K.; Fukumoto, K.; Onoda, A.; Mizohata, E.; Inoue, T.; Bocola, M.; Schwaneberg, U.; Hayashi, T.; Okuda, J. A Highly Active Biohybrid Catalyst for Olefin Metathesis in Water: Impact of a Hydrophobic Cavity in a β -Barrel Protein. *ACS Catal.* **2015**, *5* (12), 7519–7522.
- (35) Lo, C.; Ringenberg, M. R.; Gndt, D.; Wilson, Y.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes for Olefin Metathesis Based on the Biotin-(Strept)avidin Technology. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (44), 12065–12067.

- (36) Lee, L.-C.; Zhao, Y. Metalloenzyme-Mimicking Supramolecular Catalyst for Highly Active and Selective Intramolecular Alkyne Carboxylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (15), 5579–5582.
- (37) Muri, E. M. F.; Mishra, H.; Avery, M. A.; Williamson, J. S. Design and Synthesis of Heterocyclic Hydroxamic Acid Derivatives as Inhibitors of Helicobacter Pylori Urease. *Synth. Commun.* **2003**, *33* (12), 1977–1995.
- (38) Su, Q.; Ioannidis, S.; Chuaqui, C.; Almeida, L.; Alimzhanov, M.; Bebernitz, G.; Bell, K.; Block, M.; Howard, T.; Huang, S.; Huszar, D.; Read, J. A.; Rivard Costa, C.; Shi, J.; Su, M.; Ye, M.; Zinda, M. Discovery of 1-Methyl-1H-Imidazole Derivatives as Potent Jak2 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (1), 144–158.
- (39) Kelly, S. M.; Price, N. C. The Application of Circular Dichroism to Studies of Protein Folding and Unfolding. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1338* (2), 161–185.
- (40) Hart-Cooper, W. M.; Clary, K. N.; Toste, F. D.; Bergman, R. G.; Raymond, K. N. Selective Monoterpene-like Cyclization Reactions Achieved by Water Exclusion from Reactive Intermediates in a Supramolecular Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (43), 17873–17876.
- (41) Gómez-Suárez, A.; Oonishi, Y.; Meiries, S.; Nolan, S. P. [$\{\text{Au}(\text{NHC})\}_2(\mu\text{-OH})\][\text{BF}_4]$: Silver-Free and Acid-Free Catalysts for Water-Inclusive Gold-Mediated Organic Transformations. *Organometallics* **2013**, *32* (4), 1106–1111.
- (42) Yi Leong, W. W.; Chen, X.; Robin Chi, Y. NHC-Catalyzed Reactions of Enals with Water as a Solvent. *Green Chem.* **2013**, *15* (6), 1505–1508.

Experimental part

IX. Methods

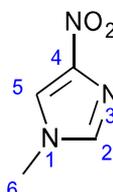
1. 4-nitro-1*H*-imidazole **38**^d



Procedure : sulfuric acid (6,6 mL) was added to imidazole (1.0 g, 14.7 mmol) slowly then nitric acid (3.0 mL) was added drop wise. The reaction was stirred at 50°C during 3h then added Na₂CO₃ till pH = 2. The mixture was filtrated to obtain a white solid and then recrystallized in acetic acid to afford after filtration a white solid. Yield : 680 mg (37%)

¹H NMR (DMSO-d₆) δ ppm 7.83 (s, 1H, H₅), 8.30 (s, 1H, H₂), 13.1 (s, 1H, NH).

2. 1-methyl-4-nitro-1*H*-imidazole **39**^e



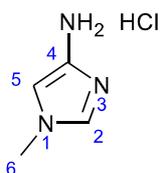
Procedure: K₂CO₃ (293 mg, 2.06 mmol) and methyl iodide (362 mg, 2.63 mmol) were added to a solution of **38** (200 mg, 1.75 mmol) in acetonitril (5 mL). The reaction was refluxed overnight then filtered and the filtrate was evaporated. Then **39** purified by chromatography (SiO₂, DCM/ MeOH : 100/0 to 95/5). Then evaporated the solvent and recrystallized in isopropanol to afford a white solid. Yield : 200 mg (88%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.84 (s, 3 H, H₆), 7.43 (s, 1 H, H₂), 7.77 (d, *J* = 1 Hz, 1 H, H₅).

^d Muri, E. M. F.; Mishra, H.; Avery, M. A.; Williamson, J. S. *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 1977–1995.

^e Su, Q.; Ioannidis, S.; Chuaqui, C.; Almeida, L.; Alimzhanov, M.; Beberitz, G.; Bell, K.; Block, M.; Howard, T.; Huang, S.; Huszar, D.; Read, J. A.; Rivard Costa, C.; Shi, J.; Su, M.; Ye, M.; Zinda, M. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 144–158.

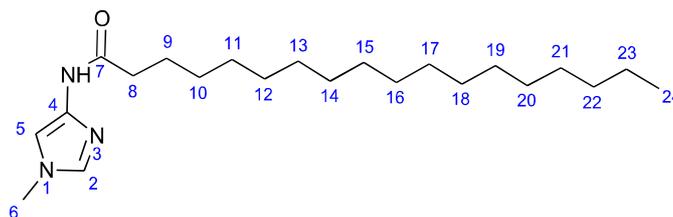
3. 1-methyl-1*H*-imidazol-4-amine hydrochloride **40**^e



Procedure: Added Pd/C (274 mg, 1.9 mmol) to a solution of **39** (1,0 g, 7.0 mmol) in ethanol (200 mL). The reaction was stirred under atmosphere of H₂ overnight. The solution was filtrated on a pad of celite and the filtrate evaporated. After evaporation a brown solid is formed and dissolved in small amount of ethanol (50 mL) and added a solution of HCl (11 M, 3 mL). The reaction was stirred 1h, then concentrated and afford a white solid. Yield : 1,2 g (80%)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.70 (s, 3H, H₆), 6.59 (s, 1H, H₂), 8.44 (s, 1H, H₅).

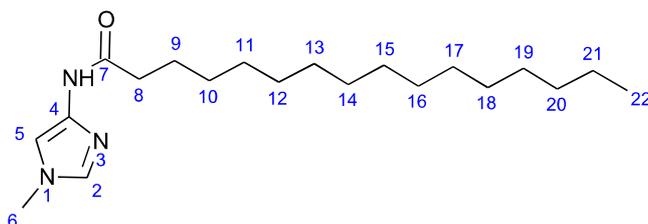
4. *N*-(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)steramide **41-s**



Procedure A: Hydrohybenzotriazol **42** (610 mg, 1.8 mmol) and K₂CO₃ (525 mg, 3.8 mmol) were added to a solution of **40** (252 mg, 1.9 mmol) in acetonitrile (10 mL). The reaction was stirred 5 h at reflux then the mixture was filtrated and the solvent was evaporated then the residue was recrystallized in ethanol the afford after filtration a white solid. Yield : 172 mg (25%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.88 (t, *J* = 7 Hz, 3H, H₂₄), 1.33 (m, 28H, H₁₀₋₂₃), 1.70 (q, *J* = 16 Hz, 3H, H₉), 2.37 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H₈), 3.66 (s, 3H, H₆), 7.18 (d, *J* = 1 Hz, 1H, H₂), 7.33 (d, *J* = 1 Hz, 1H, H₅), 9.80 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14.2 (C₂₄), 22.7 (C₂₃), 25.6 (C₉), 29.4, 29.5, 29.6, 29.72, 29.73, 29.8, 29.9, 32.1 (C₁₀₋₂₂), 34.1 (C₆), 36.9 (C₈), 108.3 (C₅), 132.5 (C₂), 138.4 (C₄), 170.8 (CO). IR (ν, cm⁻¹) : 2923 (ν C-H), 1670 (ν C=O), 1576 (ν N-H), 1476 (ν C=C), 1238 (ν C-N), 846 (ν C-H). ESI-HRMS (m/z) : found : 364.3345 (M+H⁺) (calc for C₂₂H₄₁N₃O₁ : 364.3250).

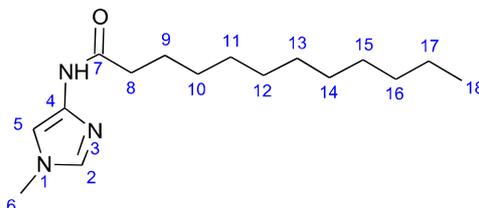
5. *N*-(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)palmitamide 41-p



Following procedure A : **42** (779 mg, 2.3 mmol) and K_2CO_3 (663 mg, 4.8 mmol) were added to a solution of **40** (332 mg, 2.5 mmol) in acetonitrile (15 mL). To afford a white solid. Yield : 210 mg (25%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H_{22}), 1.38 (m, 28H, H_{10-21}), 1.68 (q, $J = 16$ Hz, 3H, H_9), 2.36 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_8), 3.65 (s, 3H, H_6), 7.16 (d, $J = 1$ Hz, 1H, H_2), 7.32 (d, $J = 1$ Hz, 1H, H_5), 9.78 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 14.25 (C_{22}), 22.8 (C_{21}), 25.8 (C_9), 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.72, 29.76, 29.8, 32.1 (C_{10-20}), 34.0 (C_6), 36.7 (C_8), 108.2 (C_5), 132.6 (C_2), 138.3 (C_4). IR (ν , cm^{-1}) : 2950 (ν_{C-H}), 1668 ($\nu_{C=O}$), 1568 (ν_{N-H}), 1575 ($\nu_{C=C}$), 1257 (ν_{C-N}), 802 (ν_{C-H}). ESI-HRMS (m/z): found : 336.3357 ($M+H^+$) (calc for $C_{20}H_{39}N_3O_1$: 336.3515).

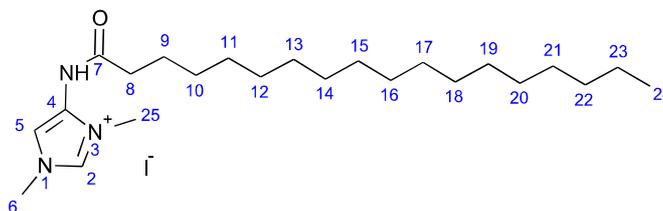
6. *N*-(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)dodecanamide 41-l



Following procedure A: **42** (126 mg, 0.4 mmol) and K_2CO_3 (165 mg, 1.2 mmol) were added to a solution of **40** (66 mg, 0.5 mmol) in acetonitrile (5 mL). To afford a white solid. Yield : 49 mg (35%)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 0.87 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_{18}), 1.29 (m, 13H, H_{10-17}), 1.70 (q, $J = 7$ Hz, 2H, H_9), 2.36 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_8), 3.66 (s, 3H, H_6), 7.15 (d, $J = 1$ Hz, 1H, H_2), 7.31 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H_5), 9.08 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 14.2 (C_{18}), 22.8 (C_{17}), 25.8 (C_9), 36.8 (C_8), 29.5, 29.6, 29.74, 29.75, 29.76, 29.8 (C_{10-16}), 33.9 (C_6), 36.8 (C_8), 108.2 (C_5), 133.0 (C_2), 138.3 (C_4), 170.3 (CO). IR (ν , cm^{-1}) : 2916 (ν_{C-H}), 1693 ($\nu_{C=O}$), 1577 (ν_{N-H}), 1467 ($\nu_{C=C}$), 1236 (ν_{C-N}), 837 (ν_{C-H}). ESI-HRMS (m/z): found : 280.2301 ($M+H^+$) (calc for $C_{16}H_{29}N_3O$: 280.2353).

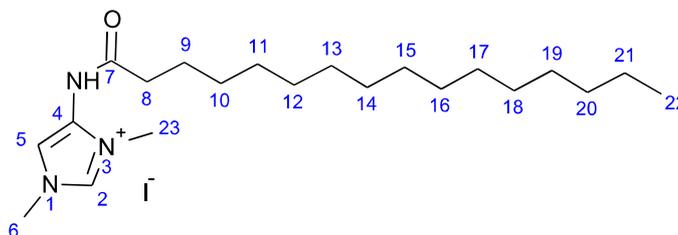
7. 1,3-dimethyl-4-(steroylamino)-1*H*-imidazol-3-ium iodide 43-s



Procedure B: methyl iodide (0.27 mL, 3.5 mmol) was added to a solution of **41-s** (509 mg, 1.4 mmol) in THF (1 mL) the reaction was stirred overnight at reflux. Then evaporated the solvent to afford a yellow solid. Yield : 148 mg (28 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 7$ Hz, 3H, H_{24}), 1.35 (m, 28H, H_{10-23}), 1.64 (q, $J = 7$ Hz, 2H, H_9), 2.67 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_8), 3.94 (s, 3H, H_6), 4.09 (s, 3H, H_{25}), 7.40 (s, 1H, H_5), 9.01 (s, 1H, H_2), 9.82 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 13.1 (C_{24}), 21.6 (C_{23}), 23.7 (C_9), 24.2, 28.0, 28.1, 28.5, 28.6, 28.7, 28.8, 28.9, 29.1, 29.2, 32.7 (C_{10-22}), 34.4 (C_6), 35.5 (C_8), 36.1 (C_{25}), 113.3 (C_5), 129.3 (C_2), 131.4 (C_4), 176.4 (CO). IR (ν , cm^{-1}) : 2917 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1698 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1578 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1456 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1239 ($\nu_{\text{C-N}}$), 806 ($\nu_{\text{C-H}}$). ESI-HRMS (m/z) : found : 379.2311 ($\text{M}+\text{H}^+$) (calc for $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}$: 379.1543).

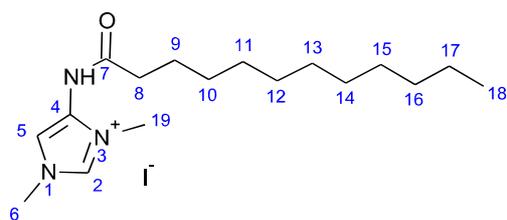
8. 1,3-dimethyl-4-(palmytoylamino)-1*H*-imidazol-3-ium iodide 43-p



Following procedure B: from methyl iodide (0.15 mL, 2.0 mmol) was added to a solution of **41-p** (269 mg, 0.8 mmol) in THF (5 mL). To afford a yellow solid. Yield : 78 mg (28 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.87 (t, $J = 7$ Hz, 3H, H_{22}), 1.45 (m, 24H, H_{10-21}), 1.60 (q, $J = 7$ Hz, 2H, H_9), 2.68 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_8), 3.93 (s, 3H, H_6), 4.07 (s, 3H, H_{23}), 7.39 (s, 1H, H_5), 8.98 (s, 1H, H_2), 9.80 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 13.4 (C_{22}), 21.7 (C_{21}), 23.8 (C_9), 24.4, 27.9, 28.0, 28.1, 28.2, 28.3, 28.4, 28.5, 28.6, 28.7, 30.9, 32.8, (C_{10-20}), 34.5 (C_6), 35.6 (C_8), 36.1 (C_{23}), 113.8 (C_5), 129.4 (C_2), 131.5 (C_4), 176.4 (CO), IR (ν , cm^{-1}) : 2918 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1709 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1580 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1457 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1240 ($\nu_{\text{C-N}}$), 812 ($\nu_{\text{C-H}}$). ESI-HRMS (m/z): found : 351.2151 ($\text{M}+\text{H}^+$) (calc for $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}$: 351.2134).

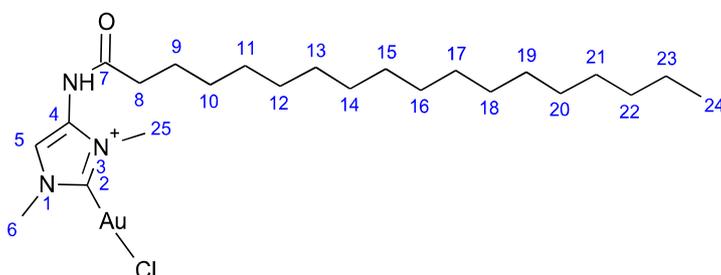
9. 1,3-dimethyl-4-(dodecanoylamino)-1*H*-imidazol-3-ium iodide **43-I**



Following procedure B ; from methyl iodide (30 μ L, 0.4 mmol) was added to a solution of **41-I** (84 mg, 0.3 mmol) in THF (1 mL) to afford a yellow solid. Yield : 27 mg (30 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.84 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_{18}), 1.34 (m, 13H, H_{10-17}), 1.67 (q, $J = 7$ Hz, 2H, H_9), 2.64 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_8), 3.94 (s, 3H, H_6), 4.02 (s, 3H, H_{19}), 7.37 (d, $J = 1$ Hz, 1H, H_5), 8.96 (d, $J = 1$ Hz, 1H, H_2), 9.65 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 13.2 (C_{18}), 18.40 (C_{17}), 22.85 (C_9), 29.3, 29.6, 29.7, 29.9, 32.1 (C_{10-16}), 35.9 (C_6), 36.7 (C_8), 36.1 (C_{19}), 115.8 (C_5), 130.0 (C_2), 131.3 (C_4), 177.1 (CO). IR (ν , cm^{-1}) : 2919 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1712 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1579 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1460 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1242 ($\nu_{\text{C-N}}$), 812 ($\nu_{\text{C-H}}$). ESI-HRMS (m/z): found : 295.2531 ($\text{M}+\text{H}^+$) (calc for $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}$: 295.1233).

10. Complexe **44-s**

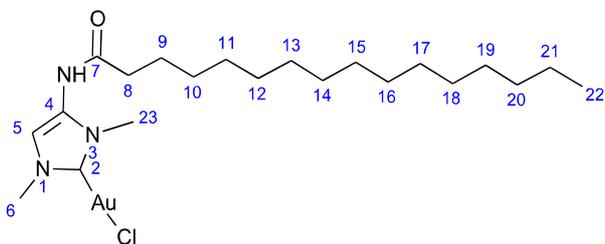


Procedure C: **43-s** (100 mg, 0.26 mmol) and Ag_2O (31 mg, 0.13 mmol) were dissolved in DCM (2 mL). The reaction mixture was stirred 10 h at room temperature. A solution of $\text{Au}(\text{SMe}_2)\text{Cl}$ (75 mg, 0.26 mmol) was added to the reaction mixture and stirred 16 h more. The reaction was filtrated and filtrate was dried. Then crystallization DCM / hexane (1 / 5) was made to afford a yellow solid. Yield : 79 mg (50 %)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.87 (t, $J = 7$ Hz, 3H, H_{24}). 1.26 (s, 26H, H_{10-23}), 1.76 (m, 1H, H_9), 2.64 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_8), 3.88 (s, 3H, H_6), 4.04 (s, 3H, H_{25}), 7.43 (s, 1H, H_5), 8.92 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.1 (C_{24}), 22.6 (C_{23}), 22.7 (C_9), 25.2, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 31.6, 31.9, 34.6 (C_{10-22}), 36.1 (C_6), 36.7 (C_8), 53.4 (C_{25}), 113.1 (C_5), 132.7 (C_2), 132.5 (C_4), 173.7 (CO). IR (ν , cm^{-1}) : 2935 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1712 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1578 ($\nu_{\text{N-}}$

H), 1460 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1243 ($\nu_{\text{C-N}}$), 812 ($\nu_{\text{C-H}}$). ESI-HRMS (m/z): found : 611.2178 ($\text{M}+\text{H}^+$) (calc for $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}\text{AuCl}$: 611.3458).

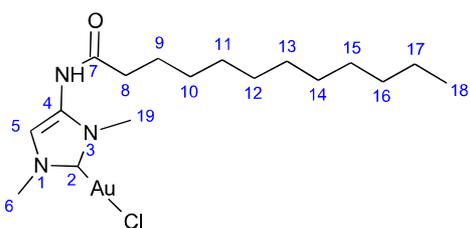
11. Complexe 44-p



Following procedure C: from **43-p** (100 mg, 0.28 mmol) and Ag_2O (34 mg, 0.14 mmol) was dissolved in DCM (2 mL), then $\text{Au}(\text{SMe}_2)\text{Cl}$ (81 mg, 0.28 mmol). To afford a white yellow
Yield : 85 mg (50 %)

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 7$ Hz, 3H, H_{22}), 1.28 (s, 26H, H_{10-21}), 1.75 (m, 1H, H_9), 2.65 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_8), 3.90 (s, 3H, H_6), 4.06 (s, 3H, H_{23}), 7.46 (s, 1H, H_5), 8.94 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.5 (C_{22}), 22.8 (C_{21}), 22.7 (C_9), 25.7, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 31.6, 31.9, 34.6 (C_{10-20}), 36.7 (C_6), 37.1 (C_8), 54.6 (C_{23}), 113.4 (C_5), 132.9 (C_2), 132.5 (C_4), 173.7 (CO). IR (ν , cm^{-1}) : 2945 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1715 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1579 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1459 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1249 ($\nu_{\text{C-N}}$), 806 ($\nu_{\text{C-H}}$). ESI-HRMS (m/z): found : 583.2748 ($\text{M}+\text{H}^+$) (calc for $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}\text{AuCl}$: 583.2715).

12. Complexe 44-l



Following procedure C : from **43-l** (53 mg, 0.18 mmol) and Ag_2O (18 mg, 0.09 mmol) was dissolved in DCM (2 mL), then $\text{Au}(\text{SMe}_2)\text{Cl}$ (31 mg, 0.18 mmol). To afford a yellow solid.
Yield : 10 mg (20 %)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.89 (t, $J = 7$ Hz, 3H, H_{18}), 1.30 (s, 26H, H_{10-17}), 1.78 (m, 1H, H_9), 2.70 (t, $J = 7$ Hz, 2H, H_8), 3.94 (s, 3H, H_6), 4.09 (s, 3H, H_{19}), 7.50 (s, 1H, H_5), 8.96 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14.5 (C_{18}), 22.8 (C_{17}), 22.7 (C_9), 25.7, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.8, 29.9, 31.6, 31.9, 34.6 (C_{10-16}), 36.7 (C_6), 37.1 (C_8), 54.6 (C_{19}), 113.4

(C₅), 133.4 (C₂), 132.5 (C₄), 173.7 (CO), IR (ν , cm⁻¹) : 2945 (ν C-H), 1716 (ν C=O), 1580 (ν N-H), 1462 (ν C=C), 1223 (ν C-N), 808 (ν C-H). ESI-HRMS (m/z): found : 527.2778 (M+H⁺) (calc for C₁₇H₃₂N₃OAuCl: 527.7898).

X. Circular dichroism spectroscopy.

The CD spectrum of **44-l** and **44-s** was obtained by the same method developed in the first experimental part for the palladium.

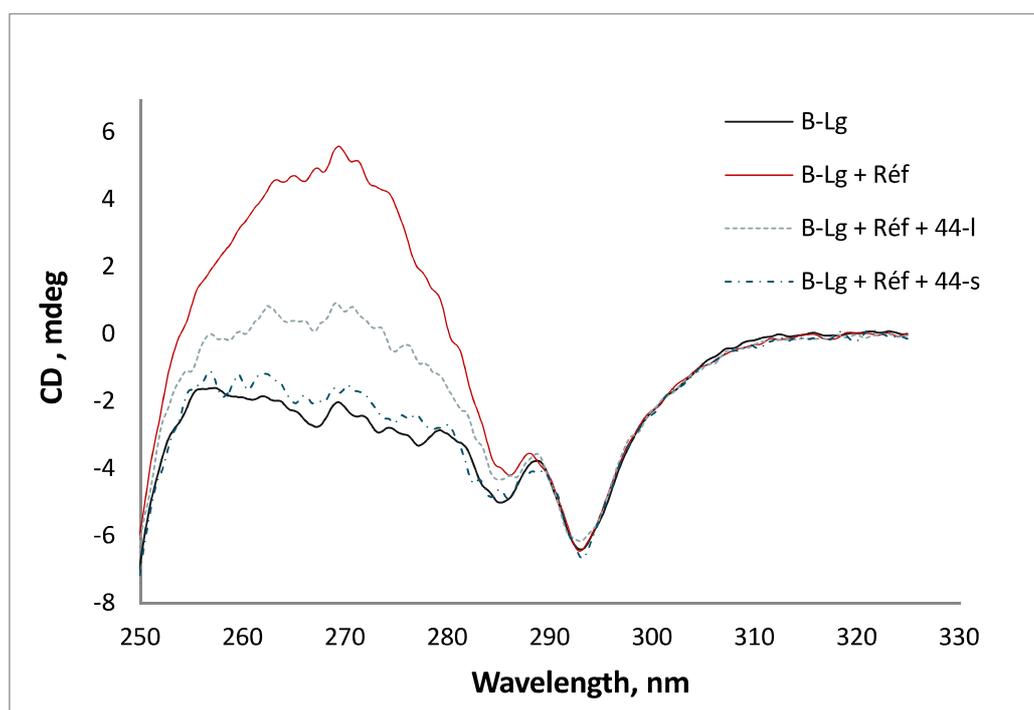


Figure 100 : CD spectrum of β -Lg, β -Lg + Réf , β -Lg + Réf + 44-l et , β -Lg + Réf + 44-s

XI. General procedure for the catalytic reactions between enals and chalcones :

The solution was successively charged with imadazolium salt (250 μ L of 100 mM, 25 μ mol, 10 mol%) enal (48 mg, 0.37 mmol), chalcone (52mg, 0.25 mmol), and NaOH (20 mg, 0.5 mmol) in water (0.5 mL). The reaction was stirred at 40 °C for 24 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and extracted using minimal amount of EtOAc, dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography.

Beta-LG (30 μmol , 20% mol) was solubilized in 1 mL of phosphate buffer pH = 7.5. A solution of imidazolium salt **44-p** (250 μL of 100 mM solution, 25 μmol , 10% mol) was added and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solution was charged with NaOH (20 mg, 0.5 mmol) and stirred for one hour more then the enal (48 mg, 0.37 mmol), and chalcone (52 mg, 0.25 mmol) were added. The reaction was stirred at 40 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and extracted using minimal amount of EtOAc, dried over Na_2SO_4 and evaporated under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography.

XII. General Procedure for the Cyclization :

Beta-LG (24 μmol , 20% mol) was solubilized in 1 mL of phosphate buffer pH = 7.5. A solution of gold complex **45-p** (125 μL of 100 mM solution, 12 μmol , 10% mol), was added and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. Then the enyne (16.0 mg, 0.128 mmol) was dissolved in DMSO (0.2 mL) and the resulting solution was added to the solution of protein and gold complex. After 20 hours of stirring at room temperature the product was extracted with CDCl_3 (1 mL) and dried by passing through a pipette filled with magnesium sulfate, directly into an NMR tube for analysis.

CONCLUSION

Nous avons conçu et synthétisé trois séries de métalloenzymes artificielles obtenues par ancrage supramoléculaire de trois séries de cofacteurs métalliques fonctionnalisés par des chaînes aliphatiques de différentes longueurs assurant la liaison de haute affinité à la protéine hôte bêta-lactoglobuline bovine. Pour l'ensemble des complexes, la caractérisation des biocatalyseurs hybrides et l'introduction des espèces métalliques dans la β -lactoglobuline a été démontrée, et finalement l'étude de leurs propriétés catalytiques effectuée.

Dans le deuxième chapitre, le travail entrepris avec les complexes de palladium à ligand pince NCN a permis de connaître l'environnement des complexes une fois insérés dans la protéine. Les études de docking ont, dans un premier temps, permis de visualiser l'insertion des complexes préalablement synthétisés, puis elles ont servi à concevoir de nouveaux complexes possédant une meilleure affinité pour la protéine grâce à la formation de liaisons hydrogène avec les acides aminés à l'entrée de la cavité de la protéine. Grâce au docking, un screening d'une large banque de molécules a pu être réalisé et ce dans un temps assez court, surtout si l'on compare avec des méthodes telles que l'analyse structurale par diffraction des RX. Ces catalyseurs hybrides ont permis d'élargir le champ des réactions aux condensations d'aldol, qui sont des réactions qui n'avaient jamais été réalisées avec des ArMs. La condensation d'aldol entre le pivalaldéhyde et le tert-butylisocynoacétate a été réalisée avec une inversion totale de la diastéréosélectivité en présence d'une ArM comprenant un cofacteur dérivé de l'acide stéarique mais sans induction d'énantiosélectivité. Ces travaux ont d'ailleurs fait l'objet d'une publication.¹

Dans le troisième chapitre, il a été montré que des complexes semi-sandwich de ruthénium (II) comprenant un ligand chélatant N,S hémilabile sont capables de s'adapter grâce à la seconde sphère de coordination de la protéine et semblent conduire à des hybrides uniques une fois insérés dans la β -Lg. Cette adaptabilité du ligand hémilabile à l'environnement protéique a ainsi permis d'enrichir le transfert de chiralité lors de l'hydrogénation asymétrique par transfert de diverses arylcétones, et ce sans avoir recours à la modification par mutation de l'enveloppe protéique. Le rapport énantiométrique en hydrogénation asymétrique par transfert a atteint 2/98 (soit un excès énantiomérique de 96%) sur la 4-méthoxyacétophénone.

Il est vrai que si l'on compare le système β -Lg – acide gras au système (strept)avidine-biotine, la β -Lg présente quelques inconvénients, tels que la transition de Tanford liée à la mobilité de la boucle EF qui limite la gamme de pH d'utilisation de la protéine. En effet pour avoir une insertion des complexes il faut se trouver entre pH 7 et 9. Mais aussi l'affinité entre les acides gras et la β -Lg reste assez faible (μ M) en comparaison de l'affinité de la biotine pour la (strept)avidine (10^{-13} – 10^{-15} M), obligeant à utiliser la protéine en excès afin de favoriser la forme complexée.

Néanmoins ces travaux ont montré que l'utilisation de la β -Lg pouvait permettre d'exemplifier et d'améliorer de nombreuses réactions grâce à un ancrage supramoléculaire facilitant la formation des ArMs. De plus, son utilisation est facilitée par son faible prix (190 euros les 1 g contre 311 euros les 25 mg de streptavidine) qui rend possible son emploi en très grande quantité, comme cela a été le cas avec les complexes de palladium. Enfin, la β -Lg a permis d'enrichir la sélectivité des réactions mises en jeu dans cette thèse sans pour autant avoir recours à une quelconque mutation de la structure protéique, contrairement aux ArMs avec la streptavidine où des mutations sont souvent nécessaires pour améliorer la sélectivité.

L'utilisation de la β -Lg comme protéine hôte s'est révélée être un challenge réellement intéressant pour la diversification des métalloenzymes artificielles.

Enfin, il reste encore des développements à faire notamment avec les complexes de ruthénium qui nécessiteront des analyses structurales par docking et / ou de diffraction RX afin d'apporter une idée plus précise de l'origine de la sélectivité de ces molécules. Il est aussi possible d'envisager une ouverture vers des complexes semi-sandwich de rhodium(III) et d'iridium(III), en utilisant les mêmes ligands que pour le ruthénium.

Les métalloenzymes artificielles à base de complexes carbéniques d'or pourraient permettre d'accéder à des catalyseurs hybrides innovants. Ceux-ci nécessitent toutefois des études supplémentaires afin de mieux évaluer leur réactivité / stabilité dans l'eau. Un encombrement plus important au niveau des azotes du cœur imidazole pourrait être envisagé, il serait même possible de venir directement fonctionnaliser un des azotes par une chaîne aliphatique et ainsi faciliter la synthèse des complexes, mais permettrait aussi d'avoir un groupement plus encombrant sur le deuxième azote (Figure 101).

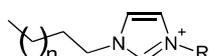


Figure 101 : imidazole fonctionnalisé par une chaîne aliphatique au niveau de l'azote

PUBLICATION

Artificial Metalloenzymes | Very Important Paper |

VIP Supramolecular Anchoring of NCN-Pincer Palladium Complexes into a β -Barrel Protein Host: Molecular-Docking and Reactivity InsightsLucrèce Pocquet,^{[a][‡]} Nikolay Vologdin,^{[a][‡]} Giuseppe Felice Mangiatordi,^{[c][‡]} Ilaria Ciofini,^[b] Orazio Nicolotti,^[c,d] Serge Thorimbert*^[a] and Michèle Salmain*^[a]

Abstract: Several prochiral NCN-pincer complexes of palladium(II), with hemilabile ligands and a long aliphatic chain, were synthesized and characterized spectroscopically. In some of the complexes, the presence of two different substituents on the N donor atoms made them stereogenic, so that they were isolated as a mixture of diastereoisomers, which could be differentiated by ¹H NMR spectroscopy. Binding of some of these complexes to bovine β -lactoglobulin by insertion within its inner cavity was theoretically investigated by molecular-docking sim-

ulations and was experimentally confirmed by CD spectroscopy. Adjunction of H-bond donor substituents on the ligand framework gave more-stable supramolecular protein-complex assemblies. These constructs were shown to catalyze aldol condensation reactions in aqueous media, affording, in some cases, the less-favorable *cis* product. Since the corresponding complexes exclusively gave the *trans* product in the absence of β -lactoglobulin, this unusual diastereoselectivity was ensued by the second sphere of coordination brought by the protein host.

Introduction

The concept of artificial metalloenzymes has emerged to fill the gap between metal- and enzyme-based catalytic transformations.^[1] Pioneered by Wilson and Whitesides in 1978,^[2] it is a rapidly developing and highly promising field of research. By definition, artificial metalloenzymes are hybrid constructs containing a catalytically active transition-metal complex incorporated within a biomacromolecular host, typically a protein, peptide, or DNA by covalent, dative, or supramolecular binding.^[3] Such constructs are meant to combine the typical advantages of both enzymatic and (organo)metallic catalysts, such as the high turnovers of biocatalysts and the wide substrate scope of metal catalysts, and at the same time, to overcome some of the limitations of both systems.^[4] To date, artificial metalloenzymes have been designed to catalyze asymmetric (transfer)

hydrogenation of ketones and imines,^[5] epoxidation,^[6] and sulfoxidation,^[7] as well as an increasing range of abiotic reactions, such as C–H bond activation,^[8] Michael additions,^[9] Diels–Alder reactions,^[9b,10] and so on.

The rational design of artificial metalloenzymes is a very challenging task, because of the difficulty of identifying effective complementarities between a given metal complex and the biological host. In this scenario, molecular docking, a well-known computational method commonly employed in drug design, can be useful to predict the most likely conformations (poses) of a given ligand in a protein binding site, as well as for estimating the strength of the interaction between both partners. On the basis of a benchmark study, Robles et al. recently showed that such a computational technique could efficiently be adapted to the design of artificial metalloenzymes, foreseeing an increased use of this approach in the near future.^[11]

In the classical hybrid construct approach, the metal and its surrounding achiral ligands (the first coordination sphere) are responsible for the catalytic activity, while the protein scaffold, including the amino acid residues at a short range from the metal center (the second coordination sphere), is responsible for driving the selectivity by favoring a single orientation of the substrate in the protein binding site (Scheme 1).^[12] Herein, we introduce a new approach called “dormant chirality”, where the metal is coordinated by prochiral hemilabile ligands. In this approach, the local 3D protein arrangement may force the synthetic metal cofactor to adopt a single stereo configuration so as to minimize steric/electronic repulsions within the host protein (Scheme 1).

This could, in turn, bring the chiral center(s) closer to the substrate and eventually enhance the enantioselectivity of the

[a] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), 4 Place Jussieu, 75005 Paris, France
E-mail: serge.thorimbert@upmc.fr
Michele.salmain@upmc.fr
<http://www.ipcm.fr/presentation-682>

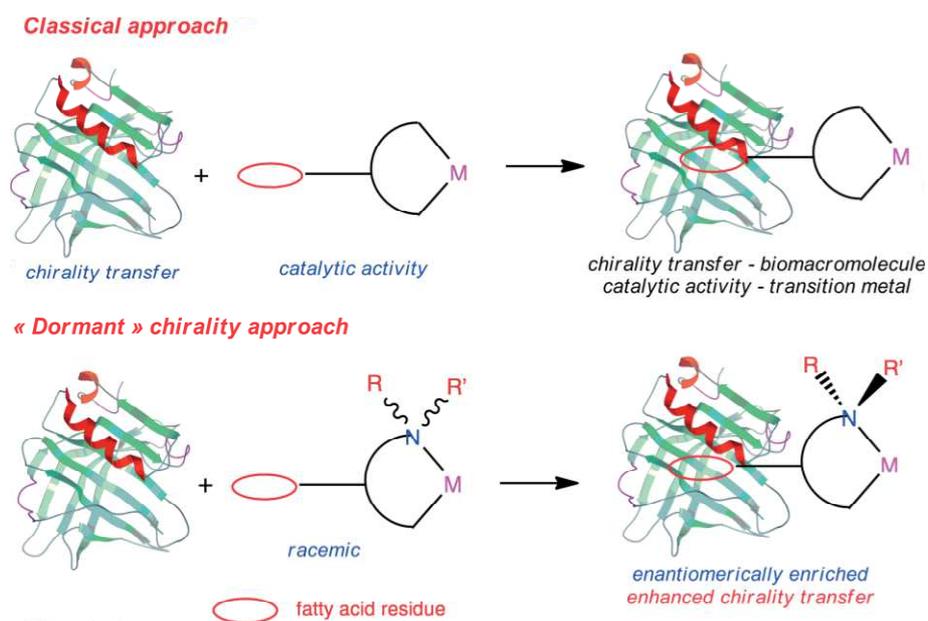
[b] PSL Research university, Chimie ParisTech, CNRS Institut de Recherche de Chimie Paris (IRCP), 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

[c] Dipartimento di Farmacia - Scienze del Farmaco, Università di Bari “Aldo Moro”, Via Orabona 4, 70126 Bari, Italy

[d] Centro Ricerche TIREs, Università di Bari “Aldo Moro”, Via Amendola 173, 70126 Bari, Italy

[‡] The first three authors contributed equally to the work.

Supporting information and ORCID(s) from the author(s) for this article are available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/ejic.201700365>.



Scheme 1. The classical and “dormant chirality” approaches in the design of artificial metalloenzymes.

catalyzed reaction. As a proof-of-concept, we chose the β -lactoglobulin (β -LG)/fatty-acid supramolecular assembly, from which we previously built artificial transfer hydrogenases with promising activity and selectivity for the reduction of a prochiral ketone.^[13] Palladium(II) complexes of prochiral hemilabile NCN-pincer ligands carrying a fatty-acid side chain were synthesized and characterized spectroscopically. In addition, binding of the new complexes to β -LG was investigated by circular dichroism (CD) spectroscopy and molecular-docking simulations were performed to predict the most probable orientation of the synthetic metal cofactors within the β -LG binding site and to validate the “dormant chirality” concept. Finally, the catalytic activity of the supramolecular constructs was examined on model aldol-condensation reactions.

Results and Discussion

Synthesis of Palladium(II) Pincer Complexes of Fatty Acids and Study of Their Structural Properties

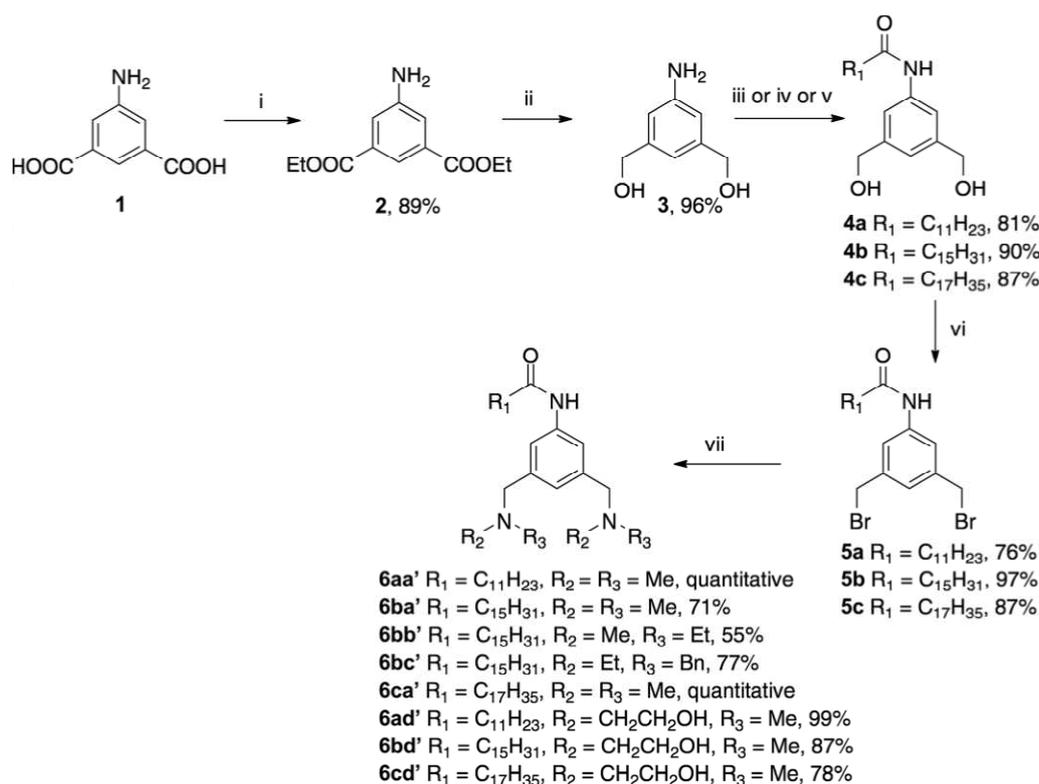
Several strategies have been devised to incorporate palladium(II) entities into proteins. The first one, reported by Van Koten et al., consisted of the site-specific and covalent anchoring of ECE-pincer Pd^{II} complexes to the enzyme cutinase by reaction with the active-site serine residue.^[14] A similar route was applied to convert a lipase into an enzyme that catalyzed Heck coupling reactions.^[15] Covalent anchoring of a monophosphine to a cysteine residue of the PYP protein, followed by treatment with [Pd(allyl)Cl]₂ afforded a metalloenzyme that catalyzed an allylic amination reaction.^[16] Dative assembly of an (allyl)Pd^{II} complex to apoferritin afforded a heavily metallated protein that catalyzed a Suzuki coupling reaction with good turnover.^[17] Supramolecular anchoring of biotinylated phosphine Pd^{II} complexes to (strept)avidin afforded hybrid enzymes that

catalyzed allylic alkylation or Suzuki cross-coupling reactions with high conversion and enantiomeric excess.^[18]

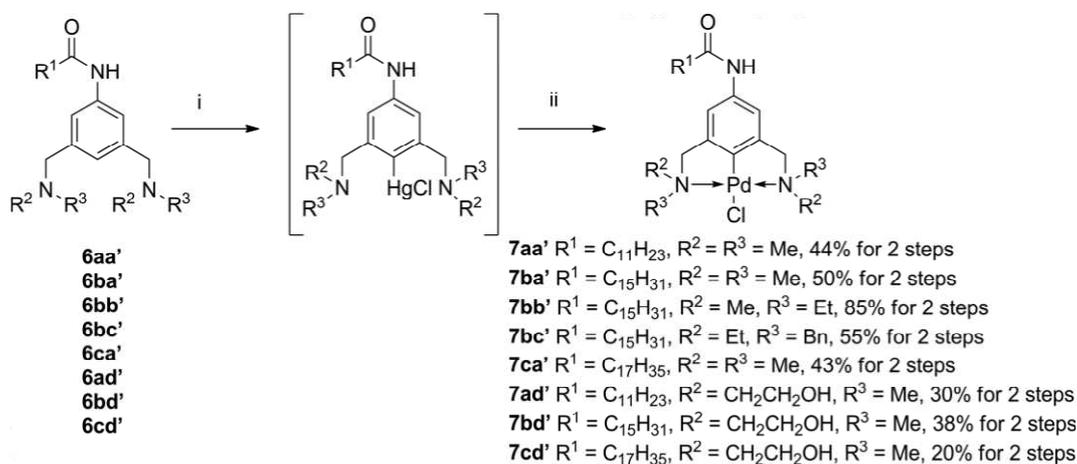
As recalled above, β -LG is an attractive protein host for the construction of artificial metalloenzymes by supramolecular anchoring because of its high affinity for fatty acids having a chain length of more than 12 carbon atoms. On the other hand, palladium complexes of NCN-pincer ligands are water- and air-tolerant and display versatile catalytic properties.^[19] Therefore, we undertook to synthesize NCN-pincer ligands to which an aliphatic chain of 11, 15, or 17 carbon atoms was appended to the aromatic ring. The general synthetic route is depicted in Scheme 2.

Commercially available 5-aminoisophthalic acid **1** was esterified and subsequently reduced by LiAlH₄ to afford (5-amino-1,3-phenylene)dimethanol **3** in good yield.^[20] Acylation of the amino group of **3** was carried out to introduce the aliphatic chains. To append the 11-carbon substituent, **3** was allowed to react with lauric acid in the presence of HOBT and EDCI to yield **4a**. Introduction of the stearyl chain was achieved by a reaction with stearyl chloride to yield **4c**. Attempts to prepare compound **4b** by reaction of palmitic acid in the presence of DCC or EDCI were unsuccessful or gave poor yields. So acylation was finally achieved by reaction of 1-palmitoyl-1*H*-1,2,3-benzotriazole prepared on the side.^[21] Treatment of compounds **4a–c** with HBr gave the dibromides **5a–c** that were readily converted into the pincer ligands **6aa'–cc'** by reaction with the corresponding secondary amines [a': HN(Me)₂; b': HNMeEt; c': HNEtBn].

Attempts to directly metallate the pincer ligands with Pd(OAc)₂ or [(PhCN)PdCl₂] were unsuccessful or gave poor yields. Alternatively, silylation of compound **6aa'** by a reaction with *n*BuLi, followed by Me₃SiOTf, under the conditions reported in the literature,^[22] afforded a mixture of mono- and disilylated products. So palladation of selected pincer ligands



Scheme 2. (i) $SOCl_2$, EtOH, 6 h, reflux; (ii) $LiAlH_4$, THF, reflux 4 h then overnight at room temp.; (iii) lauric acid, BtOH, EDCI, THF/DMF, 0 °C then reflux 24 h; (iv) stearoyl chloride, $NaHCO_3$, THF, reflux 16 h; (v) 1-palmitoyl-1H-1,2,3-benzotriazole, THF, 48 h reflux; (vi) $HBr/AcOH$ (33 %) overnight, room temp.; (vii) R_2R_3NH , K_2CO_3 , MeCN, reflux overnight.



Scheme 3. (i) $Hg(OAc)_2$, EtOH, reflux then $LiCl$, EtOH reflux 15 min; (ii) $Pd(OAc)_2$, DCM/MeOH, overnight, room temp. then $LiCl$, MeOH, 1 h, r.t.

was done in two steps by transmetalation of organomercury intermediates (Scheme 3).^[23]

Treatment of the ligands with $Hg(OAc)_2$ afforded the mercurated derivatives, which underwent a transmetalation reaction with $Pd(OAc)_2$ to give the Pd-pincer complexes **7aa'**, **7ba'**, **7bb'**, **7bc'**, and **7ca'** in moderate yields.

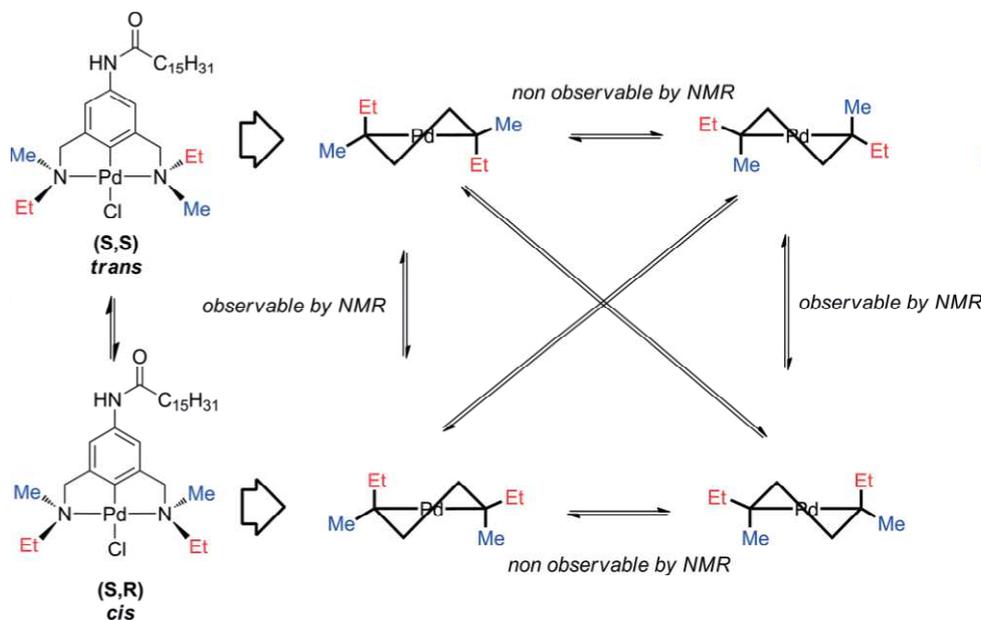
Formation of the palladium complexes **7aa'**–**7ca'** was evidenced by the disappearance of the signal of the aromatic proton in the *para* position of the amide and an upfield shift of 0.4 ppm of the two protons in the *ortho* position. In contrast,

the methyl and benzylic protons of **7aa'**–**7ca'** underwent a downfield shift of 0.7 and 0.5 ppm, respectively. In the ^{13}C NMR spectra, the signals of methyl and benzylic carbon atoms also underwent a downfield shift of 8 and 12 ppm, respectively, and the signal of the quaternary carbon coordinating Pd appeared at $\delta = 151.0$ ppm.

Compounds **7bb'** and **7bc'** displayed more-complex 1H NMR spectra, owing to the presence of stereogenic centers on the two nitrogen atoms. Coordination of palladium blocks nitrogen inversion and leads to the formation of a mixture of three

stereoisomers: (S_N, S_N), (R_N, R_N), and (S_N, R_N) (Scheme 4). A variable-temperature NMR spectroscopic study was conducted to examine the possible exchange between stereoisomers. On the ^1H NMR spectrum of **7bb'** in CDCl_3 at 300 K, two sets of sharp signals (four doublets for the benzylic protons, two singlets for the NCH_3 protons, four doublets of quartets for NCH_2CH_3 pro-

tons, and two triplets for the NCH_2CH_3 protons) were observed, in agreement with the presence of *cis* and *trans* isomers with respect to the coordination plane. The integral values gave a diastereomeric ratio of 56:44, which was not influenced by a change of temperature. Decreasing the temperature to 263 K, as well as slight heating to 313 K, did not induce significant



Scheme 4. Possible exchanges between stereoisomers of **7bb'** and **7bc'**.

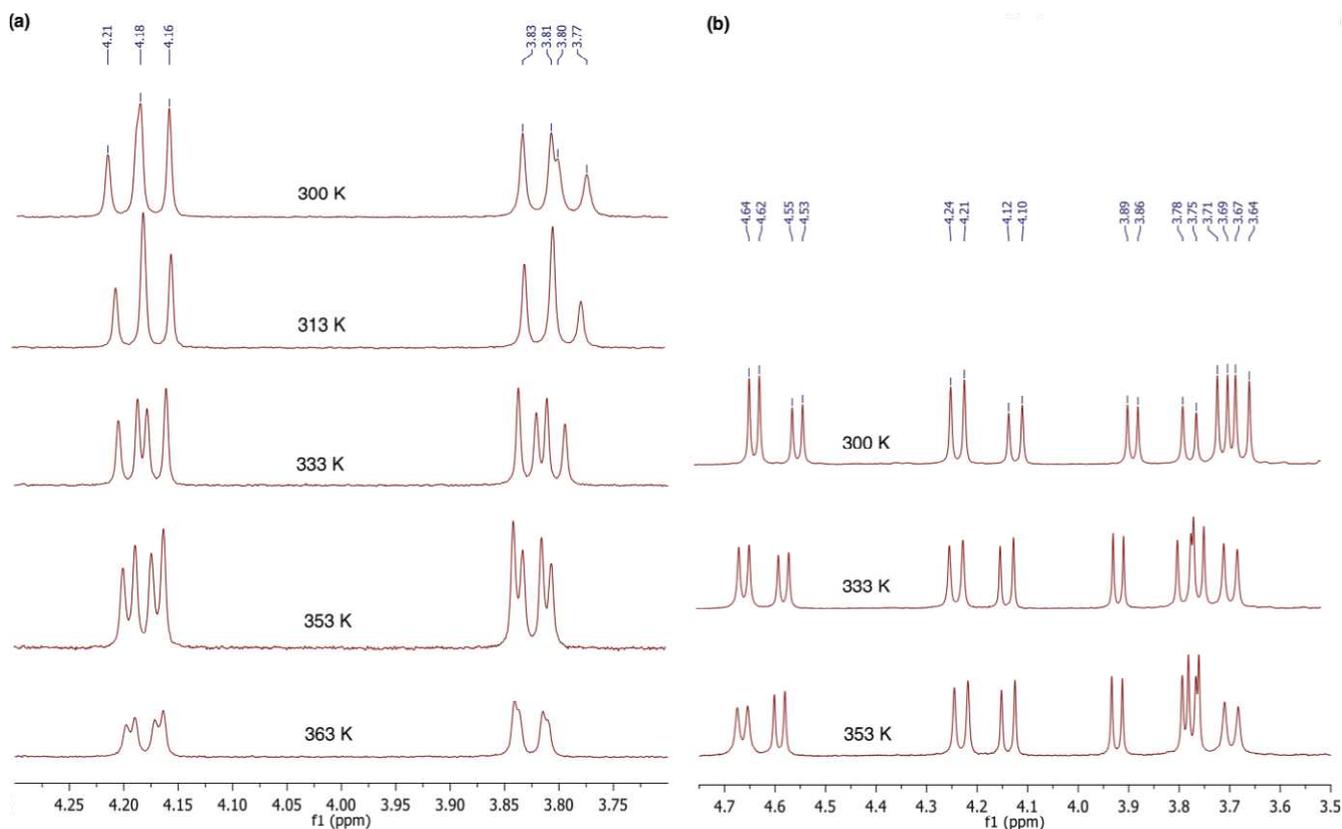
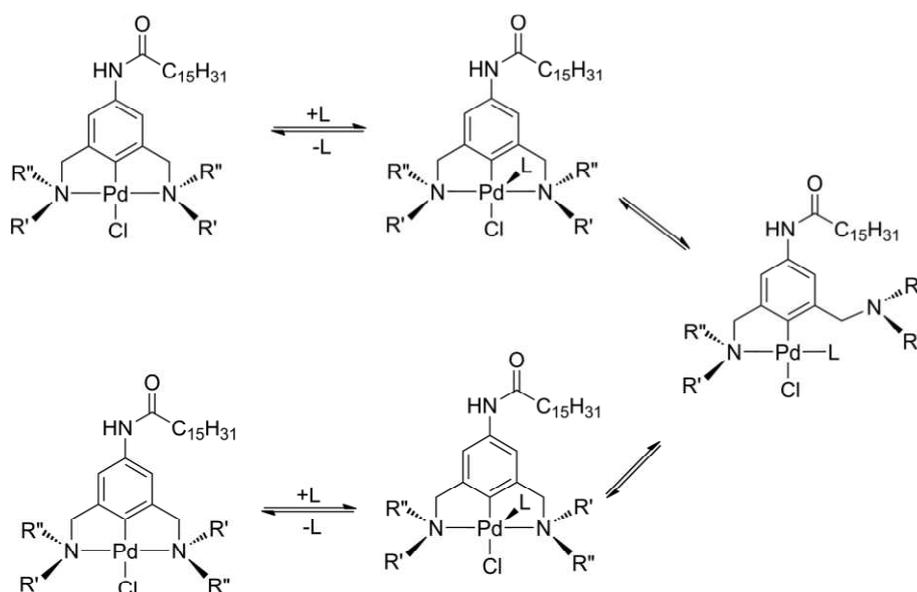


Figure 1. Temperature-dependent ^1H NMR spectra of: (a) **7bb'**; and (b) **7bc'** in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$.



Scheme 5. Possible mechanism for *cis/trans* isomerization of complexes **7bb'** and **7bc'** in coordinating solvent L.

changes in the proton NMR spectrum, which indicates slow exchange or its absence. On the other hand, in $[D_6]DMSO$, the signals were broad. Increasing the temperature caused a decrease of $\Delta\sigma$ between the corresponding signals of the stereoisomers. For the benzylic protons, coalescence was observed at 363 K (Figure 1a). Similar behavior was observed for compound **7bc'**, with a diastereomeric ratio of 61:39 at 300 K. At 353 K, the diastereomeric ratio became 56:44, there was a change in $\Delta\sigma$ of 7–18 Hz, and no coalescence was observed (Figure 1b).

Spectral analysis gave an estimated Gibbs free energy for the major–minor isomer exchange of 63.3 kJ/mol at 300 K for **7bb'** and 61.6 kJ/mol at 300 K for **7bc'**, which matches values of similar complexes.^[24] This study showed that the *cis/trans* exchange occurs in solution; it is relatively slow and could be observed by 1H NMR spectroscopy, in contrast to chelate-ring conformational exchange.^[25] Notably, the rate of this exchange increases with the temperature and in the presence of coordinating solvents, which can be explained by the exchange mechanism depicted in Scheme 5.^[24]

Binding Studies of Ligands and Palladium Pincer Complexes to β -LG by Circular Dichroism Spectroscopy

Beta-lactoglobulin (β -LG) is a member of the lipocalin family, which displays a β -barrel tertiary structure made of eight anti-parallel β -strands. The cavity generated by this folding can host various hydrophobic ligands, including fatty acids.^[26] We previously took advantage of this feature to incorporate half-sandwich dipyriddyamine Rh^{III} complexes within β -LG, which conferred transfer hydrogenase properties to this protein.^[13]

The near-UV circular dichroism spectrum of β -LG displays a pattern of negative bands between 250 and 310 nm assigned to its aromatic residues.^[27] Binding of a chromophore to β -LG may induce a change of the CD spectrum caused by its presence in the chiral environment of the protein (extrinsic effect) or by perturbation of the environment of the aromatic residues (intrinsic effect).^[28] Unfortunately, no significant change of the near-UV CD spectrum of the protein was noticed upon addition of ligands **6aa'**–**6ca'** (1 equiv.) to β -LG in phosphate buffer pH

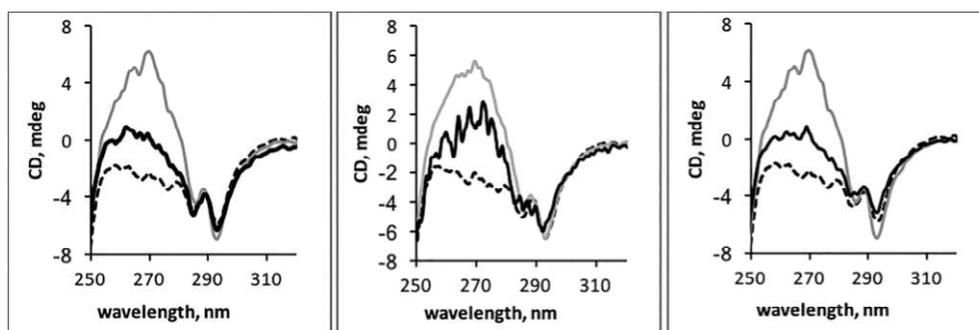


Figure 2. Near-UV CD spectra of β -LG (dotted black line), β -LG + Ref (gray line), and β -LG + Ref + Pd complex (black line) in 20 mM phosphate buffer pH 7.5. Left: **7ba'**; middle: **7bc'**; right: **7bb'**.

7.5 (Figure S1a). The same experiment was carried out with some of the Pd complexes. As for the ligands, no significant change of the CD spectrum was observed (not shown). Therefore, a displacement experiment was carried out as follows. The CD spectrum of a stoichiometric mixture of β -LG and *N,N*-dipyridin-2-hexadecanamide (**Ref**), whose insertion within the β -LG cavity was previously asserted by CD spectroscopy,^[13b] was first recorded. A broad positive band centered at 270 nm was observed on the CD spectrum of the mixture of β -LG and **Ref**. Upon addition of a stoichiometric amount of **7ba'** and **7bb'**, derived from palmitic acid, the intensity of the positive band was shown to decrease significantly as a result of the partial displacement of **Ref** by the Pd complexes from the β -LG cavity (Figure 2). In contrast, the CD spectrum of the mixture of β -LG, **Ref**, and **7bc'** became very noisy as a result of the insolubility of **7bc'** in the buffer. Thus, near-UV CD spectroscopy provided indirect and qualitative evidence of the ability of the Pd complexes **7ba'** and **7bb'**, derived from palmitic acid, to bind to β -LG by probable insertion within the hydrophobic binding pocket of the protein ("calyx"). The far-UV CD spectrum of β -LG displayed a broad negative band, centered on ca. 215 nm (Figure S1b), typical of β -sheet proteins. Addition of a stoichiometric amount of **7ba'**, **7bb'**, or **7bc'** to the protein solution induced no change in the spectrum, indicating that the secondary structure was maintained upon binding of **7ba'** and **7bb'**.

Docking Studies

The top-scoring poses obtained for compounds **7ba'**–**7bc'** are shown in Figure 3. As mentioned above, these compounds are characterized by an aliphatic chain of 15 carbon atoms, an organometallic "head" with the metal and its coordination sphere, and an amide group linking the aliphatic chain to the organometallic head. Gratifyingly, all of the poses show the aliphatic chain inside the calyx, as expected. In addition, **7ba'**, as well as all of the diastereoisomers of **7bb'**, establish an H-bond interaction with the backbone of Asp85. Such interactions involve the nitrogen atom of the backbone. As far as **7bc'** is concerned, the only diastereoisomer establishing an H-bond interaction with the protein is **7bc'**(*S_N,R_N*), while no H bond can be detected by the top-scoring poses of **7bc'**(*R_N,R_N*) and **7bc'**(*S_N,S_N*). This evidence offers a glimpse of a possible explanation for the inability of **7bc'** to bind to the protein. Indeed, we can speculate that the presence of bulky substituents on the metallic head prevents the formation of an H-bond interaction between the ligand and the protein, as the occurrence of orientated interactions of its amide group are forbidden. As already mentioned, the docking posing is related to the preferred conformation adopted for binding, while the scoring represents a rough energetic estimation of the strength of the established interactions, based on the application of relatively simple molecular-mechanics equations.

In this respect, it is acknowledged that the main drawback of docking simulations is the accuracy of the estimation of the binding energy. This is the sum of a number of different energetic terms, which normally award larger-sized ligands the intrinsic capability of being able to establish more interactions,

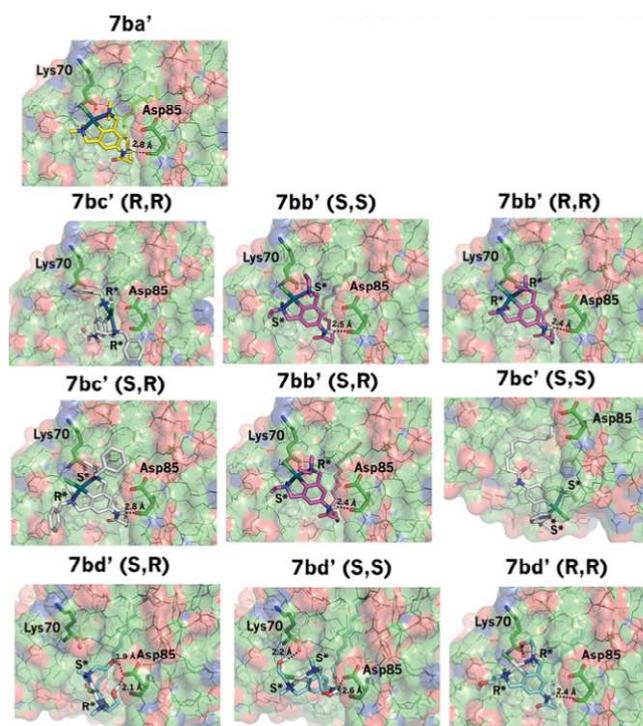


Figure 3. Top-scoring docking poses of **7ba'**, **7bb'**, **7bc'**, and **7bd'**. Ligands and important residues are rendered as sticks, while the protein is shown as a surface. H-bond interactions are depicted by dotted lines. For the sake of clarity, only the polar hydrogen atoms are displayed.

especially the hydrophobic ones, which are dominant in determining protein–ligand affinity.^[29] On the basis of this evidence, it would be misleading to estimate the binding energies of compounds on the sole basis of docking scores when large differences in their sizes occur. In this respect, it is important to notice that, although larger, **7bc'** gives the worst docking scores, whichever stereoisomer is considered: -8.10 kcal/mol for **7bc'**(*S_N,R_N*), -7.80 kcal/mol for **7bc'**(*R_N,R_N*), and -7.65 kcal/mol for **7bc'**(*S_N,S_N*), as compared with **7ba'** (-8.16 kcal/mol) and **7bb'** [-8.57 kcal/mol for **7bb'**(*S_N,R_N*), -8.44 kcal/mol for **7bb'**(*S_N,S_N*), and -8.33 kcal/mol for **7bb'**(*S_N,S_N*)]. In other words, both posing and scoring would indicate that the binding of **7bc'** to β -LG is less favorable than the binding of **7ba'** and **7bb'**, in agreement with the experimental results. Correlatively, the relative positions of the organometallic head of **7ba'** and the three diastereoisomers of **7bb'** within the protein host are identical, as illustrated in Figure 3, indicating that the ethyl substituents on the nitrogen atoms are not discriminating enough to favor a given stereo configuration.

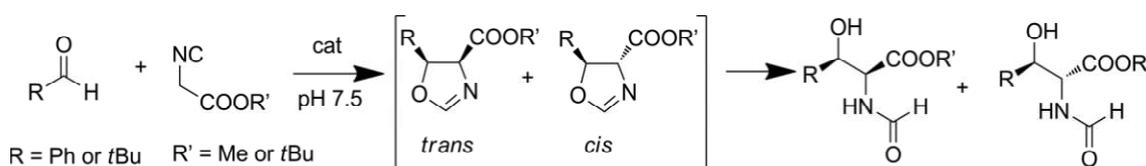
Notably, the organometallic heads of all of the considered ligands do not establish any strong interaction with the protein residues, thus suggesting the presence of different conformations after the formation of the protein–ligand complex. This is in full agreement with the electron-density map derived from X-ray diffraction of a similar metal complex bound to β -LG (PDB code 4KII).^[30] However, visual inspection of the obtained poses indicates the presence of polar and charged residues potentially able to establish strong H-bond interactions with H-bond acceptors or donors carried by the organometallic head. Examples

are represented by the side chain of Asp85 and Lys70, both very close to the organometallic head of the top-scoring pose of **7ba'**. On the basis of these observations, a large chemical library of palladium pincer complexes with various H-bond acceptors and donors bound to the organometallic head was screened. From this *in silico* investigation, compound **7bd'**, carrying a hydroxyethyl group on the N atoms, was predicted to display higher affinity for the protein host thanks to additional H-bond interactions. This is evident in Figure 3 where the top-scoring poses of all of the diastereomers of **7bd'** are shown. Indeed, the presence of hydroxyethyl groups bound to the organometallic head allows the establishment of strong H-bond interactions with the side chains of Asp85 (all of the **7bd'** diastereomers) and Lys70 [**7bd'**(*S_N,S_N*) and **7bd'**(*R_N,R_N*)]. The importance of such interactions is again supported by the obtained docking scores. Indeed, **7bd'**(*S_N,R_N*), **7bd'**(*S_N,S_N*), and **7bd'**(*R_N,R_N*) provide better docking scores with respect to all of the other investigated compounds, being equal to -10.20 kcal/mol, -9.60 kcal/mol, and -8.80 kcal/mol, respectively. Conversely to **7bb'**, the relative position of the organometallic head was, this time, dependent on the diastereomer, so this may later influence the outcome of the catalyzed reaction.

Therefore, complexes **7ad'**–**7cd'** were synthesized according to the general route depicted in Schemes 2 and 3. The presence of stereogenic centers on the two nitrogen atoms made the benzylic as well as the hydroxyethyl protons magnetically inequivalent. Long-distance coupling between the aromatic protons and one of the benzylic protons was also observed. The occurrence of stereoisomers in solution was deduced from the presence of two singlets for the N–Me protons of **7ad'**–**7cd'**.

Binding of **7ad'**–**7cd'** to β -LG was subsequently studied by near-UV CD spectroscopy. Interestingly, a significant change in the CD spectrum of β -LG was noticed upon addition of a stoichiometric amount of **7bd'** and **7cd'**, as an increase of the CD signal was observed at ca. 260 nm, where the complexes absorb, along with an observable decrease of the intensity of the two bands at 285 and 293 nm, which are assigned to the two Trp residues of β -LG (Figure 4).

This induced positive CD signal is likely to be due to the binding of both complexes to β -LG and the positioning of the chromophore within the chiral environment of the protein. In contrast, addition of **7ad'** to the solution of β -LG led to the nearly complete disappearance of the two negative bands at 285 and 293 nm, indicating that the anisotropic environment of the tryptophan residues was disrupted by the presence of **7ad'**.^[31] Since the far-UV CD spectrum of the mixture of β -LG and **7ad'** was superimposable on that of β -LG alone (Figure S1b), the binding of **7ad'** did not affect the secondary β -sheet structure of β -LG.



Scheme 6. Aldol condensation between isocyanoacetate and aldehyde in aqueous medium.

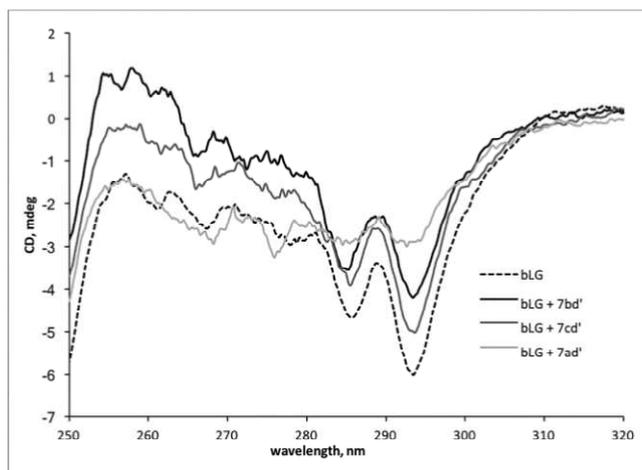


Figure 4. Near-UV CD spectra of β -LG (dotted black line) and stoichiometric mixtures of β -LG and Pd complexes **7ad'**, **7bd'**, and **7cd'** in phosphate buffer (20 mM, pH 7.5).

Catalysis Studies

Palladium pincer complexes display versatile catalytic properties.^[19] In particular, owing to their Lewis acid character, originating from the labile chlorido ligand, these complexes have been successfully used in aldol and Michael-type reactions. Both of these reactions are synthetically very useful, since they involve C–C bond formation and the creation of chiral centers. Aldol condensation between aldehydes and isocyanoacetates give access to oxazolines carrying two stereocenters (Scheme 6), which, in turn, afford β -hydroxyamino acids upon hydrolysis. NCN-pincer palladium complexes carrying C- and N-centered stereogenic centers have been shown to catalyze such a reaction with variable regio- and enantioselectivities.^[32]

The first experiments were carried out with the benchmark substrates methyl isocyanoacetate and benzaldehyde (R = Ph, R' = Me in Scheme 6). To the best of our knowledge, this reaction had never been attempted in an aqueous medium. Therefore, the two substrates were allowed to react in phosphate buffer (pH 7.5) in the presence of a catalytic amount of Pd(OAc)₂ at the preparative scale. In these conditions, no oxazoline was formed and the reaction product was identified as a formamide derivative (Scheme 6) resulting from the opening of the oxazoline ring in the presence of water. The ¹H NMR spectroscopic analysis of the raw product indicated that it was obtained as a mixture of *cis* and *trans* diastereomers in the proportion 18:82 and a yield of 52 % (Table 1). Purification by column chromatography yielded only the *trans* diastereoisomer in a pure form.

Prior to catalysis runs, the pincer complexes were treated with AgBF₄ (1 equiv.) to generate the cationic complexes, and

Table 1. Aldol condensation of methyl isocyanoacetate and benzaldehyde.^[a]

β -LG [mol-%]	Complex	Conversion [%] ^[b]	<i>trans/cis</i> ^[b]	<i>er (trans)</i> ^[c]
0	Pd(OAc) ₂	52	82:18	50:50
0	–	3	50:50	50:50
15	–	2	50:50	50:50
0	7bb'	56	46:54	50:50
15	7bb'	49	38:62	50:50
0	7bd'	7	49:51	50:50
15	7bd'	5	62:38	57:43

[a] Reaction conditions: 2.5 μ mol methyl isocyanoacetate, 3 μ mol benzaldehyde, 10 mol-% complex in phosphate buffer (0.5 mL of 20 mM, pH 7.5), 25 °C, 3.5 h. [b] Determined by RP-HPLC analysis of the reaction mixtures on Nucleosil C18 HTec, H₂O/MeCN, 95:5 to 0:100 in 40 min. [c] Determined by HPLC on Kromasil 5-celulocel, hexane/2-propanol 98:2 for 19 min then to 96:4 in 11 min at 1 mL/min.

silver salts were carefully removed from the reaction mixture by filtration through celite. In the ¹H NMR spectrum, formation of the cationic, aqua complex of **7ba'** resulted in the upfield shift of the protons of the four Me groups by 0.13 ppm, which is in agreement with literature data.^[33] In the ¹³C NMR spectrum, the C coordinating the palladium center also underwent an upfield shift of ca. 5 ppm upon aquation. A cationic product with the same ¹H NMR spectrum was also obtained by treatment of **7ba'** with Me₃SiOTf.^[32c] Then the reaction was performed at the analytical scale (2.5 μ mol) in the presence of β -lactoglobulin and **7bb'** or **7bd'**. As control experiments, the same reaction was carried out with the complexes alone, with the protein alone, or without any additive. Disappearance of benzaldehyde was monitored by RP-HPLC analysis of the reaction mixtures every 15 min (Figure S2). Rapid consumption of benzaldehyde was observed in the presence of 10 mol-% **7bb'** alone or β -LG-**7bb'**, while the rate of disappearance of benzaldehyde was much slower in the presence of **7bd'** or β -LG-**7bd'**. No difference in the rate was noticed with or without β -LG. Notably, disappearance of benzaldehyde was even slower in the absence of the Pd catalyst. Formation of formamide was checked by MS analysis. After 3.5 h, conversions in formamide and diastereomeric ratios (*dr*) were calculated from the RP-HPLC profiles of the reaction mixtures. They were then extracted with di-isopropyl ether and the organic extracts were analyzed by chiral HPLC to determine the enantiomeric ratios (*er*) (Table 1).

In the absence of the Pd catalyst (with or without β -LG), conversions to formamide were very modest and product was obtained as a 1:1 mixture of *cis* and *trans* adducts. Both pincer complexes displayed some catalytic activity, but **7bb'** was much more active than **7bd'**. This lack of activity of **7bd'** might be attributed to the presence of coordinating OH groups in the β -position of the N atoms,^[32g,32h] which compete with methyl isocyanoacetate for binding to the free coordination site on the metal center. In both cases, no regioselectivity was observed, since the product was obtained as 1:1 *trans/cis* ratio. Finally, when the reaction was carried out in the presence of β -LG, slightly lower conversions were observed (compared with the complexes alone), as well as moderate induction of diastereoselectivity in favor of the *cis* isomer for β -LG-**7bb'** or the *trans* isomer for β -LG-**7bd'**.

Another series of experiments was performed with bulkier substrates; namely, pivalaldehyde and *tert*-butyl isocyano-

acetate (R = R' = *t*Bu in Scheme 6). Results are gathered in Table 2. This time, no reaction occurred in the absence of the catalyst, likely owing to the steric hindrance brought by the *tert*-butyl substituents borne by the two substrates.

Table 2. Aldol condensation of *tert*-butyl isocyanoacetate and pivalaldehyde.^[a]

β -LG [mol-%]	Complex	Conversion [%] ^[b]	<i>trans/cis</i> ^[b]
0	–	0	–
0	Pd(OAc) ₂	60	100:0
10	–	0	–
0	7ba'	44	100:0
10	7ba'	9	85:15
10	7ba' ^[c]	10	83:17
0	7bb'	28	100:0
10	7bb'	20	71:29
0	7bc'	16	50:50
10	7bc'	20	54:46
0	7bd'	5	100:0
10	7bd'	13	11:89
0	7ad'	11	100:0
10	7ad'	17	39:61
0	7cd'	5	100:0
10	7cd'	7	0:100

[a] Reaction conditions: 40 μ mol *tert*-butyl isocyanoacetate, 50 μ mol pivalaldehyde, 10 mol-% complex in phosphate buffer (10 mL of 20 mM, pH 7.5), 3 d at r.t. [b] Determined by HPLC on Kromasil 5-celulocel, hexane/2-propanol 98:2 for 19 min, then to 96:4 in 11 min at 1 mL/min. [c] **7ba'** was treated with Me₃SiOTf instead of AgBF₄ before catalysis run.

Addition of Pd(OAc)₂ (10 mol-%) to the mixture of substrates afforded exclusively the *trans*-formamide adduct in 60 % conversion (Table 2). All of the pincer palladium complexes also catalyzed the condensation of pivalaldehyde and *tert*-butyl isocyanoacetate to the corresponding formamide (as checked by MS), albeit with lower conversions than those of the former couple of substrates. Again, the three pincer palladium complexes with pendant OH groups (**7ad'**–**7cd'**) gave much lower yields than the three other complexes under study. In nearly all cases, only the *trans*-formamide adduct was obtained, in agreement with the general trend observed with achiral and chiral pincer complexes (see ref.^[32g] and refs. therein). Upon the addition of β -LG, the diastereomeric ratio markedly changed, since a significant proportion of *cis* product was obtained. The *cis*-formamide was even the major product when β -LG-**7ad'**, β -LG-**7bd'**, or β -LG-**7cd'** were used as catalysts.

This series of assemblies gave slightly higher yields than the complexes alone and the proportion of *cis* product increased with the aliphatic chain length. Such a change of *dr* may have been induced by the protein environment forming the second coordination sphere that favors the attack of the aldehyde on one side of the metal-bound enolate embedded in the protein. This may be the case for the hybrid catalysts resulting from the insertion of **7ba'** and **7bb'** into β -LG and for which the same *dr* was determined. Alternatively, the metal complex may be forced by the protein host to adopt a preferential stereo configuration and diastereoselectivity may be subsequently transferred to the reaction product. This may be the case for the hybrids of **7ad'**, **7bd'**, and **7cd'** that afforded 61–100 % *cis* product, depending on the alkyl chain length. In the series of palladium catalysts, compound **7bc'** behaves anomalously, since it

afforded an equimolar mixture of *cis* and *trans* isomers, and addition of β -LG had no influence on the reaction outcome, which infers that this complex is unable to bind to the protein host.

Conclusion

We synthesized and characterized several new prochiral pincer palladium(II) complexes based on hemilabile ligands and studied their structural properties. The ^1H NMR spectroscopic studies showed that, in solution, complexes **7bb'** and **7bc'**, carrying stereogenic centers on the N-donor atoms, exist as mixtures of diastereoisomers, with diastereomeric ratios of 61:39 and 56:44, respectively. Moreover, it was found that the *cis/trans* exchange occurs and it can be accelerated in coordinating solvents and by heating. Circular dichroism experiments suggested that insertion of some of the pincer complexes into the β -lactoglobulin cavity did occur. This assumption was nicely confirmed by molecular-docking simulations. Unfortunately, no evidence of the influence of the protein's tertiary structure on the stereo configuration of complex **7bb'** was revealed by experimental circular dichroism spectroscopy, probably because of the poor chromophoric properties of this compound. Adjunction of H-bond donor substituents on the ligand framework gave much more stable supramolecular assemblies, as suggested by molecular-docking simulations and then confirmed by experimental CD measurements. All of the hybrid constructs were shown to catalyze aldol condensation reactions between isocyanacetates and aldehydes to afford β -hydroxyamino acid precursors. Unusual regioselectivity toward the *cis* product was found by combining β -LG and the pincer complexes carrying OH substituents, which may validate the "dormant chirality" concept. The authors would like to point out that by the time this paper was in press, a comprehensive review dealing with artificial metalloenzyme design and applications was released.^[34]

Experimental Section

Materials: All reactions were performed in oven-dried glassware and under an inert atmosphere. All starting materials, reagents, and catalysts were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Diethyl-5-aminoisophthalate **2**,^[20a] (5-amino-1,3-phenylene)dimethanol **3**,^[20b] and *N*-[3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl]hexadecanamide **4b**^[21] were synthesized following literature protocols. Bovine β -lactoglobulin (β -LG; mixture of isoforms A and B) was purchased from Sigma-Aldrich (ref.: L2506). Anhydrous tetrahydrofuran (THF) was obtained from a Pure Solv™ Purification System. Analytical thin-layer chromatography was performed with Merck silica gel 60F glass plates and flash chromatography was undertaken by using Merck silica gel 60 (230–400 mesh). The ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded with AV600, AV400 and AV300 NMR spectrometers (Bruker). Chemical shifts (δ) are expressed as ppm, referenced to the solvent residual signals (i.e., chloroform: ^1H δ = 7.26 ppm, ^{13}C δ = 77.2 ppm; dimethyl sulfoxide: ^1H δ = 2.50 ppm, ^{13}C δ = 39.5 ppm; and methanol: ^1H δ = 3.31 ppm, ^{13}C δ = 49.0 ppm). Splitting patterns are expressed as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; p, pentet; m, multiplet; br, broad. High-resolution mass spectra (HRMS) data are reported in *m/z*.

***N*-[3,5-Bis(hydroxymethyl)phenyl]dodecanamide (4a):** Lauric acid (396 mg, 1.98 mmol), *N*-hydroxybenzotriazole (101 mg, 0.75 mmol), and (5-amino-1,3-phenylene)dimethanol (**2**) (310 mg, 2 mmol) were dissolved in THF (20 mL). The resulting solution was cooled to 0 °C and a solution of EDCI (378 mg, 1.98 mmol) in DMF (3 mL) was added. The resulting mixture was refluxed for 24 h. Then, water was added and the precipitate was filtered off and dried. Yield: 540 mg (81 %). M.p.: 76 °C. ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 0.79 (t, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 1.19 (m, 16 H), 1.59 (m, 2 H), 2.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 4.48 (s, 4 H), 7.00 (s, 1 H), 7.37 (s, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD): δ = 14.8, 24.1, 26.1, 27.3, 30.7, 30.8, 31.1, 33.4, 35.1, 38.4, 65.4, 119.1, 122.4, 140.4, 144.0, 175.1 ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 3257, 2920, 2850, 1653, 1541, 1456, 1438, 1062, 1011, 850 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{NNaO}_3$ [*M* + *Na*⁺] 358.2353; found 358.2361.

***N*-[3,5-Bis(hydroxymethyl)phenyl]stearamide (4c):** Stearoyl chloride (453 mg, 1.5 mmol), sodium hydrogenocarbonate (378 mg, 4.5 mmol), and (5-amino-1,3-phenylene)dimethanol (**2**) (232 mg, 1.5 mmol) were dissolved in THF (10 mL), and the resulting solution was refluxed for 16 h. Then, the reaction mixture was poured into water and the precipitate was filtered off and dried. Yield: 550 mg (87 %). M.p.: 114 °C. ^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 0.85 (t, *J* = 7.5 Hz, 3 H), 1.23 (m, 28 H), 1.57 (m, 2 H), 2.27 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 4.44 (s, 4 H), 5.12 (s, 2 H), 6.43 (s, 1 H), 7.43 (s, 2 H), 9.76 (s, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 14.4, 22.6, 25.7, 28.7, 29.2, 29.6, 31.8, 32.5, 36.9, 63.5, 116.0, 119.5, 139.5, 143.2, 171.5 ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 3334, 2910, 2850, 1722, 1661, 1546, 1468, 1439, 1410, 1301, 1188, 1085, 1028, 867 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_3\text{Na}$ [*M* + *Na*⁺] 442.3292; found 442.3279.

***N*-[3,5-Bis(bromomethyl)phenyl]dodecanamide (5a):** General procedure A: *N*-[3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl]dodecanamide **4a** (580 mg, 1.72 mmol) was dissolved in HBr in glacial acetic acid (6 mL of a 33 % solution), and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. Then, the reaction mixture was poured into water (100 mL), the precipitate was collected, washed with petroleum ether, and dried. Yield: 371 mg (76 %). M.p.: 116 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.89 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.27 (m, 16 H), 1.72 (m, 2 H), 2.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 4.43 (s, 4 H), 7.16 (s, 1 H), 7.27 (s, 1 H), 7.54 (s, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 14.1, 22.7, 29.2, 29.5, 29.6, 32.3, 32.5, 37.7, 120.1, 125.1, 138.7, 139.2, 171.5 ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 2918, 2850, 2360, 1658, 1612, 1557, 1466, 1437, 1245, 1208, 1159, 1102, 876, 721 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{Br}_2\text{NNaO}$ [*M* + *Na*⁺] 484.0645; found 484.0634.

***N*-[3,5-Bis(bromomethyl)phenyl]stearamide (5c):** General procedure A was followed, using **4c** (589 mg, 1.40 mmol). Yield: 690 mg (90 %). M.p.: 117 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.89 (t, *J* = 6.4 Hz, 3 H), 1.26 (m, 28 H), 1.73 (m, 2 H), 2.36 (t, *J* = 7 Hz, 2 H), 4.44 (s, 4 H), 7.16 (s, 1 H), 7.24 (s, 1 H), 7.54 (s, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 14.1, 22.7, 25.5, 29.2, 29.65, 29.69, 29.8, 31.6, 32.5, 37.8, 120.1, 125.1, 138.7, 139.2, 171.5 ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 2918, 2850, 2360, 1660, 1606, 1546, 1463, 1439, 1255, 1238, 1209, 1106, 878, 719 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{Br}_2\text{NNaO}$ [*M* + *Na*⁺] 568.1604; found 568.1573.

***N*-[3,5-Bis(bromomethyl)phenyl]hexadecanamide (5b):** General procedure A was followed, using **4b** (1.17 g, 3 mmol) and HBr in glacial acetic acid (10 mL of a 33 % solution). Yield: 1.5 g (97 %). M.p.: 120 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.89 (t, *J* = 6.5 Hz, 3 H), 1.27 (m, 24 H), 1.73 (m, 2 H), 2.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 4.44 (s, 4 H), 7.16 (s, 1 H), 7.19 (s, 1 H), 7.54 (s, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 14.1, 22.7, 25.5, 29.4, 29.6, 32.5, 37.8, 120.1, 125.1, 138.7, 139.3, 171.5 ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 2918, 2850, 2360, 1658, 1612, 1558, 1466, 1438, 1265, 1208, 1159, 1102, 875, 721 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{Br}_2\text{NNaO}$ [*M* + *Na*⁺] 540.1272; found 540.1278.

***N*-[3,5-Bis[(dimethylamino)methyl]phenyl]dodecanamide (6aa')**: General procedure B: An aqueous solution of dimethylamine (5 mL, 40 %) was added to a suspension of **5a** (570 mg, 1.23 mmol) and potassium carbonate (803 mg, 5.82 mmol) in MeCN (20 mL). The resulting mixture was refluxed overnight, then cooled to room temperature and diluted with water (20 mL) and DCM (25 mL). The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with DCM (2 × 25 mL). The organic phases were combined, dried with Na₂SO₄, and the solvents were evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (DCM, then DCM/EtOH, 97:3, then DCM/EtOH/NEt₃, 93:5:2). Yield: 560 mg (99 %). M.p.: 57 °C. ¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 0.73 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 1.10 (m, 16 H), 1.54 (q, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 2.05 (s, 12 H), 2.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 3.20 (s, 4 H), 6.85 (s, 1 H), 7.27 (s, 2 H), 7.99 (s, 1 H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, MeOD): δ = 13.9, 22.4, 25.5, 29.1, 29.4, 31.6, 37.4, 45.1, 63.8, 119.2, 125.1, 137.9, 139.3, 171.6 ppm. IR: ν̄ = 2918, 2850, 1660, 1610, 1541, 1470, 1355, 1174, 1097, 877, 716 cm⁻¹. ESI-HRMS: calcd. for C₂₄H₄₄N₃O [M + H⁺] 390.3479; found 390.3482.

***N*-[3,5-Bis[(dimethylamino)methyl]phenyl]stearamide (6ca')**: General procedure B was followed, using dimethylamine (3 mL), **5c** (200 mg, 0.37 mmol), and potassium carbonate (306 mg, 2.22 mmol) in MeCN (15 mL). Yield: 280 mg (99 %). M.p.: 63 °C. ¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 3 H), 1.25 (m, 28 H), 1.70 (m, 2 H), 2.26 (s, 12 H), 2.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 3.42 (s, 4 H), 7.02 (s, 1 H), 7.35 (s, 1 H), 7.43 (s, 2 H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, MeOD): δ = 14.2, 22.7, 25.6, 29.3, 29.4, 29.7, 31.9, 45.3, 64.0, 119.3, 125.6, 138.1, 139.4, 171.4 ppm. IR: ν̄ = 2918, 2850, 1660, 1610, 1541, 1470, 1353, 1175, 1095, 874, 716 cm⁻¹. ESI-HRMS: calcd. for C₃₀H₅₆N₃O [M + H⁺] 474.4421; found 474.4491.

***N*-[3,5-Bis[(dimethylamino)methyl]phenyl]hexadecanamide (6ba')**: General procedure B was followed, using dimethylamine (5 mL), **5b** (517 mg, 1 mmol), and potassium carbonate (828 mg, 6 mmol) in MeCN (20 mL). Yield: 317 mg (71 %). M.p.: 60 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.26 (m, 24 H), 1.71 (m, 2 H), 2.25 (s, 12 H), 2.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 3.41 (s, 4 H), 7.02 (s, 1 H), 7.23 (br. s, 1 H), 7.41 (s, 2 H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 14.1, 22.7, 25.6, 29.37, 29.45, 29.7, 31.9, 37.8, 45.3, 64.0, 119.2, 125.5, 138.0, 139.6, 171.3 ppm. IR: ν̄ = 2918, 2850, 1660, 1610, 1541, 1470, 1456, 1415, 1173, 1097, 877, 716 cm⁻¹. ESI-HRMS: calcd. for C₂₈H₅₂N₃O [M + H⁺] 446.4105; found 446.4104.

***N*-[3,5-Bis[(ethyl(methyl)amino)methyl]phenyl]hexadecanamide (6bb')**: General procedure B was followed, using **5b** (400 mg, 0.77 mmol), K₂CO₃ (638 mg, 4.62 mmol), and *N*-ethylmethylamine (137 mg, 0.2 mL, 2.32 mmol). Yield: 201 mg (55 %). M.p.: 39 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 1.12 (t, *J* = 7.2 Hz, 6 H), 1.26 (m, 24 H), 1.71 (m, 2 H), 2.22 (s, 6 H), 2.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 2.49 (q, *J* = 7.2 Hz, 4 H), 3.51 (s, 4 H), 7.06 (s, 1 H), 7.46 (s, 2 H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 12.1, 14.1, 22.7, 25.6, 29.3, 29.5, 29.6, 31.9, 37.8, 41.4, 51.2, 61.5, 119.3, 125.7, 138.1, 139.3, 171.4 ppm. IR: ν̄ = 2917, 2850, 1660, 1609, 1542, 1470, 1170, 1098, 1046, 871, 716 cm⁻¹. ESI-HRMS: calcd. for C₃₀H₅₆N₃O [M + H⁺] 474.4418; found 474.4406.

***N*-[3,5-Bis[(benzyl(ethyl)amino)methyl]phenyl]hexadecanamide (6bc')**: General procedure B was followed, using **5b** (207 mg, 0.4 mmol), K₂CO₃ (332 mg, 2.4 mmol), and *N*-ethylbenzylamine (113 mg, 125 μL, 0.84 mmol). The product was purified by flash chromatography (PE/AcOEt, 8:2, then 1:1). Yield: 193 mg (77 %). M.p.: 36 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.78 (t, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 0.97 (t, *J* = 7.1 Hz, 6 H), 1.17 (m, 24 H), 1.63 (m, 2 H), 2.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 2.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 4 H), 3.45 (s, 4 H), 3.48 (s, 4 H), 7.10 (br. s, 1 H), 7.14 (m, 3 H), 7.19 (m, 4 H), 7.28 (m, 4 H), 7.33 (br. s, 1 H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 12.0, 14.1, 22.7, 25.6, 29.28,

29.33, 29.7, 31.9, 37.9, 47.1, 57.6, 57.7, 118.5, 125.0, 126.7, 128.1, 128.8, 137.9, 139.8, 140.7, 171.3 ppm. IR: ν̄ = 2918, 2849, 1657, 1613, 1558, 1461, 1382, 1251, 1149, 1073, 867, 735 cm⁻¹. ESI-HRMS: calcd. for C₄₂H₆₄N₃O [M + H⁺] 626.5044; found 626.5022.

***N*-[3,5-Bis[(ethanol(methyl)amino)methyl]phenyl]dodecanamide (6ad')**: General procedure C: *N*-[3,5-bis(bromomethyl)phenyl]dodecanamide **5a** (200 mg, 0.43 mmol) was dissolved in acetonitrile (20 mL), then K₂CO₃ (237 mg, 1.72 mmol) and methylaminoethanol (0.4 mL, 0.86 mmol) were added. The mixture was stirred overnight at reflux. After acetonitrile was evaporated under reduced pressure, DCM was added (30 mL), and the solution was washed with water, then NaHCO₃ solution, dried with anhydrous Na₂SO₄, and evaporated under reduced pressure to afford **6ad'** as a brown solid. Yield: 200 mg (99 %). M.p.: 45 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.82 (t, *J* = 6.6 Hz, 3 H), 1.19 (m, 18 H), 1.63 (m, 2 H), 2.16 (s, 6 H), 2.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 2.47 (t, *J* = 5.2 Hz, 4 H), 3.42 (s, 4 H), 3.54 (t, *J* = 5.3 Hz, 4 H), 3.62 (br. s, 3 H), 6.91 (s, 1 H), 7.38 (s, 2 H), 8.35 (br. s, 1 H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 13.9, 22.4, 25.4, 29.1, 29.14, 29.2, 29.3, 29.38, 29.42, 31.6, 37.3, 41.7, 53.3, 58.2, 58.4, 62.0, 119.1, 124.8, 138.3, 139.1, 171.9 ppm. IR: ν̄ = 3291, 2918, 2849, 1660, 1610, 1544, 1464, 1123, 1077, 1028, 877, 720 cm⁻¹. ESI-HRMS: calcd. for C₂₆H₄₈N₃O₃ [M + H] 450.3690; found 450.3685.

***N*-[3,5-Bis[(ethanol(methyl)amino)methyl]phenyl]stearamide (6cd')**: General procedure C was followed, using **5c** (200 mg, 0.37 mmol), K₂CO₃ (204 mg, 1.48 mmol), and methylaminoethanol (0.2 mL, 0.74 mmol). Yield: 157 mg (78 %). M.p.: 65 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.85 (m, 3 H), 1.23 (s, 33 H), 1.66 (s, 2 H), 2.19 (s, 6 H), 2.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H), 2.51 (s, 4 H), 3.36 (s, 2 H), 3.46 (s, 4 H), 3.57 (s, 4 H), 6.95 (s, 1 H), 7.39 (s, 2 H), 8.06 (s, 1 H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 13.9, 22.5, 25.4, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.5, 31.7, 37.3, 41.7, 58.3, 58.4, 61.9, 119.3, 124.9, 138.5, 138.7, 172.0 ppm. IR: ν̄ = 3292, 2918, 2849, 1659, 1611, 1545, 1465, 1169, 1075, 1015, 875, 681 cm⁻¹. ESI-HRMS: calcd. for C₃₂H₆₀N₃O₃ [M + H] 534.4629; found 534.4650.

***N*-[3,5-Bis[(ethanol(methyl)amino)methyl]phenyl]hexadecanamide (6bd')**: General procedure C was followed, using **5b** (200 mg, 0.38 mmol), K₂CO₃ (210 mg, 1.52 mmol), and methylaminoethanol (0.3 mL, 0.80 mmol). Yield: 167 mg (87 %). M.p.: 57 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 4 H), 1.24 (s, 30 H), 1.68 (m, 2 H), 2.24 (s, 6 H), 2.34 (m, 2 H), 2.56 (m, 4 H), 3.52 (s, 4 H), 3.61 (t, *J* = 4.73 Hz, 4 H), 3.81 (m, 2 H), 6.99 (s, 1 H), 7.45 (s, 2 H), 8.00 (s, 1 H) ppm. ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 14.0, 22.6, 25.5, 29.3, 29.5, 29.6, 31.8, 37.5, 41.8, 41.8, 58.3, 61.9, 76.6, 77.4, 119.6, 125.3, 138.7, 172.1 ppm. IR: ν̄ = 3284, 2918, 2849, 1660, 1611, 1547, 1464, 1187, 1079, 1027, 875, 720 cm⁻¹. ESI-HRMS: calcd. for C₃₀H₅₅N₃O₃ [M + H] 506.4316; found 506.4311.

Palladium(II) Pincer Complexes

Compound 7aa': General procedure D: Mercury(II) acetate (67.0 mg, 0.21 mmol) was added to a solution of **6aa'** (100 mg, 0.21 mmol) in absolute ethanol (10 mL), and the resulting mixture was refluxed for 24 h. Then, excess LiCl was added to the reaction mixture and the mixture was refluxed for 15 min. Then, the solvent was evaporated and the residue was partitioned in DCM/water (20 mL/10 mL). The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted with DCM (2 × 20 mL). Organic extracts were combined, dried with Na₂SO₄, and the solvents were evaporated. The product was used in the next step without further purification. Yield: 70 mg (57 %). The mercurated derivative (70 mg, 0.11 mmol) was dissolved in DCM/MeOH (2:1, 15 mL), and Pd(OAc)₂ (18.4 mg, 0.11 mmol) was added to this solution. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. Then, the solution was fil-

tered through Celite and the filtrate was evaporated. The residue was redissolved in MeOH (10 mL) and was treated with LiCl for 1 h. The solvent was removed under vacuum and the residue was redissolved in DCM (15 mL); this solution was filtered through Celite. The filtrate was evaporated and the residue was purified by flash chromatography (DCM/EtOH 24:1). Yield: 41 mg (77 %). ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 0.89 (t, J = 6.7 Hz, 3 H), 1.28 (s, 16 H), 1.66 (m, 2 H), 2.35 (dt, J = 14.3, 7.0 Hz, 2 H), 2.85 (s, 12 H), 3.99 (s, 4 H) 7.09 (s, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD): δ = 14.7, 23.9, 27.2, 30.3, 30.5, 30.6, 30.6, 30.8, 30.9, 33.2, 38.2, 53.5, 75.6, 113.9, 137.2, 146.7, 152.0, 174.4 ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 2918, 2849, 1654, 1599, 1542, 1452, 1337, 1258, 1180, 1042, 1028, 868, 720 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{OPd}$ [$\text{M} - \text{Cl}^-$] 494.1247; found 494.0236.

Compound 7ca': General procedure D was followed, using $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (67.0 mg, 0.21 mmol) and **6ca'** (100 mg, 0.21 mmol). Yield: 80 mg (57 %). Then $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (18.2 mg, 0.11 mmol) was added to afford **7ca'**. Yield: 47 mg (75 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.89 (t, J = 6.7 Hz, 3 H), 1.26 (s, 28 H), 1.69 (m, 2 H), 2.32 (m, 2 H), 2.94 (s, 12 H), 3.96 (s, 4 H), 7.00 (s, 2 H), 7.09 (s, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 14.1, 22.7, 25.6, 29.4, 29.6, 29.7, 31.9, 37.8, 53.2, 74.5, 112.4, 127.5, 135.13, 145.2, 176.8 ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 2916, 2848, 1658, 1546, 1462, 1440, 1055, 1033, 866 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{N}_3\text{OPd}$ [$\text{M} - \text{Cl}^-$] 579.1893; found 579.2736.

Compound 7ba': General procedure D was followed, using $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (104 mg, 0.33 mmol) and **6ba'** (145 mg, 0.33 mmol) Yield: 150 mg (67 %). Then $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (49 mg, 0.22 mmol) was added to afford **7ba'**. Yield: 96 mg (74 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.88 (t, J = 6.5 Hz, 3 H), 1.25 (s, 24 H), 1.68 (m, 2 H), 2.33 (t, J = 7.4 Hz, 2 H), 2.91 (s, 12 H), 3.94 (s, 4 H), 7.02 (s, 2 H), 7.31 (s, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 14.1, 22.7, 25.7, 29.3, 29.61, 29.64, 31.9, 37.7, 53.1, 74.4, 112.5, 135.3, 145.1, 151.8, 171.5 ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 2980, 2924, 2853, 1659, 1597, 1540, 1452, 1380, 1258, 1149, 1069, 1019, 868, 721 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{OPd}$ [$\text{M} - \text{Cl}^-$] 550.2989; found 550.3025.

Compound 7ad': General procedure D was followed, using $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (68.0 mg, 0.22 mmol) and **6ad'** (100 mg, 0.22 mmol). Palladation was carried out on the mercurated compound (80 mg, 0.11 mmol) and $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (18.2 mg, 0.11 mmol). Product **7ad'** was purified by recrystallization in diethyl ether. Yield: 20 mg (30 %). ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 3 H), 1.28 (m, 24 H), 1.68 (m, 2 H), 2.41 (m, 2 H), 2.82 (m, 2 H), 2.99 (s, 3 H), 3.02 (s, 3 H), 3.16 (m, 2 H), 3.96 (dd, J = 15.3, 7.2 Hz, 2 H), 4.24 (m, 2 H), 4.30 (m, 2 H), 4.50 (d, J = 15.3 Hz, 2 H), 7.13 (s, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD): δ = 13.5, 17.3, 22.4, 23.2, 25.9, 28.95, 29.03, 29.1, 29.3, 31.6, 36.9, 47.4, 47.6, 52.0, 52.1, 57.2, 60.7, 64.4, 72.1, 145.6, 145.8, 173.8, 180.0 ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 3295, 2920, 2849, 1655, 1598, 1547, 1451, 1123, 1072, 1049, 840 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_3\text{Pd}$ [$\text{M} - \text{Cl}^-$] 554.0917; found 554.2283.

Compound 7cd': General procedure D was followed, using $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (120 mg, 0.37 mmol) and **6cd'** (200 mg, 0.37 mmol). Palladation was carried out on the mercurated compound (121 mg, 0.18 mmol) and $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (34 mg, 0.18 mmol), as above, to afford **7cd'**. Yield: 50 mg (20 %). ^1H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 0.88 (t, J = 7.5 Hz, 3 H), 1.26 (s, 28 H), 1.67 (m, 2 H), 2.38 (s, 2 H), 2.81 (m, 2 H), 2.97 (s, 3 H), 3.00 (s, 3 H), 3.12 (m, 2 H), 3.96 (dd, J = 15.2 and 7.9 Hz, 2 H), 4.21 (m, 2 H), 4.31 (m, 2 H), 4.49 (d, J = 15.59 Hz, 2 H), 7.07 (d, J = 2.6 Hz, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): δ = 19.3, 22.1, 23.2, 27.0, 27.1, 27.2, 27.3, 27.5, 27.6, 30.3, 36.2, 54.2, 60.7, 64.4, 80.3, 125.5, 153.1, 164.2, 170.5, 197.0 ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 3300, 2918, 2835, 1644, 1610, 1544, 1450, 1123, 1078, 1023, 877, 657 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_3\text{Pd}$ [$\text{M} - \text{Cl}^-$] 638.3520; found 638.3544.

Compound 7bd': General procedure D was followed, using $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (124 mg, 0.39 mmol) and **6bd'** (200 mg, 0.39 mmol). Palladation was carried out on the mercurated compound (129 mg, 0.20 mmol) and $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (36.4 mg, 0.20 mmol), as above, to afford **7bd'**. Yield: 50 mg (38 %). ^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ = 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 3 H), 1.25 (m, 24 H), 1.58 (m, 2 H), 2.38 (t, J = 7.5 Hz, 2 H), 2.83 (td, J = 11.4 and 5.9 Hz, 2 H), 3.01 (s, 3 H), 2.98 (s, 3 H), 3.10–3.21 (m, 2 H), 3.97 (dd, J = 15.6 and 10.1 Hz, 2 H), 4.12–4.24 (m, 2 H), 4.24–4.39 (m, 2 H), 4.49 (d, J = 15.6 Hz, 2 H), 7.13 (d, J = 4.4 Hz, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD): δ = 14.6, 23.7, 27.1, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7, 33.1, 38.2, 53.2, 62.2, 62.3, 66.1, 73.4, 73.5, 113.8, 113.9, 137.0, 147.1, 147.3, 151.3, 174.9 ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 3350, 2918, 2849, 1670, 1620, 1544, 1464, 1123, 1077, 1028, 880, 747 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_3\text{Pd}$ [$\text{M} - \text{Cl}^-$] 610.1880; found 610.2838.

Compound 7bb': General procedure D was followed, using $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (202 mg, 0.63 mmol) and **6bb'** (300 mg, 0.63 mmol). Yield: 450 mg (quantitative). Then $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (142 mg, 0.63 mmol) was added. Product **7bb'** was purified by flash chromatography (DCM/EtOH, 24:1). Yield: 330 mg (85 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3 H, 1st and 2nd diastereomers), 1.25 (s, 24 H, 1st and 2nd diastereomers), 1.56 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, 1st diastereomer), 1.55 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, 2nd diastereomer), 1.67 (m, 2 H, 1st and 2nd diastereomers), 2.31 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, 1st and 2nd diastereomers), 2.53 (m, 1 H, 1st diastereomer), 2.60 (m, 1 H, 2nd diastereomer), 2.96 (s, 3 H, 2nd diastereomer), 3.00 (s, 3 H, 1st diastereomer), 3.11 (dq, J = 14.4, 7.2 Hz, 1 H, 2nd diastereomer), 3.22 (dq, J = 14.4 and 7.2 Hz, 1 H, 1st diastereomer), 3.69 (d, J = 15.5 Hz, 1 H, 1st diastereomer), 3.73 (d, J = 15.3 Hz, 1 H, 2nd diastereomer), 4.13 (d, J = 15.4 Hz, 1 H, 2nd diastereomer), 4.18 (d, J = 15.6 Hz, 1 H, 1st diastereomer), 6.99 (s, 1 H, 1st diastereomer), 7.00 (s, 1 H, 2nd diastereomer), 7.37 (s, 1 H, 1st diastereomer), 7.39 (s, 1 H, 2nd diastereomer) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 13.6 (1st diastereomer), 13.8 (2nd diastereomer), 14.2 (1st and 2nd diastereomers), 22.8, 25.8, 29.39, 29.45, 29.52, 29.60, 29.75, 29.77, 32.01 (1st and 2nd diastereomers), 37.8 (1st and 2nd diastereomers), 52.1 (2nd diastereomer), 52.2 (1st diastereomer), 58.2 (1st diastereomer), 58.4 (2nd diastereomer), 70.4 (1st diastereomer), 70.8 (2nd diastereomer), 112.0 (1st diastereomer), 112.2 (2nd diastereomer), 135.2, 146.0 (2nd diastereomer), 146.2 (1st diastereomer), 150.2 (1st diastereomer), 150.4 (2nd diastereomer), 171.6 (1st and 2nd diastereomers) ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 2924, 2853, 1659, 1601, 1540, 1452, 1384, 1258, 1147, 1072, 1019, 869, 717 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{N}_3\text{OPd}$ [$\text{M} - \text{Cl}^-$] 730.3928; found 730.3936.

Compound 7bc': General procedure D was followed, using $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (198 mg, 0.62 mmol) and **6bc'** (398 mg, 0.62 mmol). Yield: 331 mg (62 %); then $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (86 mg, 0.38 mmol), as above, to afford **7bc'**. Yield: 259 mg (89 %). ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 3 H, 1st and 2nd diastereomers), 1.26 (s, 24 H, 1st and 2nd diastereomers), 1.61 (t, J = 6.8 Hz, 3 H, 1st diastereomer), 1.65 (m, 2 H, 1st and 2nd diastereomers), 1.69 (t, J = 6.8 Hz, 3 H, 2nd diastereomer), 2.25 (m, 1 H, 1st and 2nd diastereomers), 2.40 (m, 1 H, 1st and 2nd diastereomers), 2.67 (m, 1 H, 2nd diastereomer), 2.72 (m, 1 H, 1st diastereomer), 3.41 (m, 1 H, 2nd diastereomer), 3.47 (m, 1 H, 1st diastereomer), 3.63 (d, J = 15.7 Hz, 1 H, 1st diastereomer), 3.75 (d, J = 15.7 Hz, 1 H, 2nd diastereomer), 3.93 (d, J = 12.7 Hz, 1 H, 1st diastereomer), 4.12 (d, J = 13.0 Hz, 1 H, 2nd diastereomer), 4.16 (d, J = 16.1 Hz, 1 H, 2nd diastereomer), 4.26 (d, J = 15.9 Hz, 1 H, 1st diastereomer), 4.70 (d, J = 13.0 Hz, 1 H, 2nd diastereomer), 4.78 (d, J = 12.7 Hz, 1 H, 1st diastereomer), 6.80 (s, 1 H, 1st diastereomer), 6.81 (s, 1 H, 2nd diastereomer), 7.33 (m, 8 H, 1st and 2nd diastereomers), 7.72 (s, 1 H, 1st or 2nd diastereomer), 7.86 (d, J = 6.6 Hz, 1 H, 1st or 2nd diastereomers) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ = 14.2 (1st and 2nd diastereomers), 14.5 (1st diastereomer), 14.6 (2nd diastereomer), 22.8 (1st and 2nd diastereomers), 25.8 (1st and 2nd diastereomers), 29.4, 29.4, 29.4, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.7, 29.7, 29.8, 29.8, 29.8, 32.0 (1st and 2nd diastereomers), 37.8 (1st and 2nd diastereomers), 56.5 (2nd diastereomer), 57.5 (1st diastereomer), 64.9 (1st and 2nd diastereomers), 65.4 (1st diastereomer), 65.6 (2nd diastereomer), 111.0 and 111.2 (1st and 2nd diastereomers), 128.3 (1st and 2nd diastereomers), 128.6 and 128.7 (1st and 2nd diastereomers), 132.2 and 132.3 (1st and 2nd diastereomers), 133.7 and 134.0 (1st and 2nd diastereomers), 134.9 (1st and 2nd diastereomers), 146.1 and 146.4 (1st and 2nd diastereomers), 150.0 and 150.4 (1st and 2nd diastereomers), 171.3 (1st and 2nd diastereomers) ppm. IR: $\tilde{\nu}$ = 2924, 2853, 1658, 1597, 1542, 1495, 1453, 1417, 1201, 1115, 1067, 799, 749 cm^{-1} . ESI-HRMS: calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{N}_3\text{OPd}$ [M - Cl] $^-$ 578.3308; found 578.3305.

Synthesis of Aqua Complexes: General procedure E from **7ba'**: AgBF_4 (66 mg, 0.34 mmol) was added to a solution of **7ba'** (200 mg, 0.34 mmol) in dichloromethane (10 mL). The resulting mixture was stirred for 1 h at room temperature. The reaction was filtered through celite and the filtrate was evaporated to afford the aqua complex as a yellow solid. Yield: 191 mg (86 %). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 3 H), 1.25 (br. s, 24 H), 1.72 (br. s, 2 H), 2.40 (br. s, 2 H), 2.78 (br. s, 12 H), 3.89 (br. s, 4 H), 7.03 (br. s, 2 H), 8.11 (br. s, 1 H) ppm. ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 14.1, 22.7, 25.9, 29.3, 29.5, 29.6, 29.7, 31.9, 37.5, 52.1, 73.5, 113.5, 135.6, 145.1, 176.1 ppm.

Aldol Condensation Reaction between Pivalaldehyde and tert-Butylisocyanacetate Catalyzed by the Metalloproteins: B-LG (100 mg, 10 mol-%) was solubilized in phosphate buffer (10 mL, 20 mM, pH = 7.5). A solution of aqua complex (400 μL of 10 mM in MeOH, 10 mol-%) was added and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. Pivalaldehyde (5 mg, 50 μmol) and tertbutylisocyanacetate (4 mg, 40 μmol) were added and the mixture was stirred for up to 72 h at room temperature. The aqueous solution was extracted with di-isopropylether (2×9 mL). The organic phase was evaporated to dryness; the residue was dissolved in hexane/2-propanol 1:1 (150 μL) and analyzed by chiral HPLC (Kromasil 5-cellucoat, hexane/2-propanol 98:2 for 19 min, then to 96:4 in 11 min at 1 mL/min, detection at 215 nm) to determine the diastereomeric and the enantiomeric ratios.

Aldol Condensation Reaction between Benzaldehyde and Methylisocyanacetate Catalyzed by the Metalloproteins: B-LG (10 mg, 15 mol-%) was solubilized in 20 mM phosphate buffer pH = 7.5 (0.5 mL). A solution of aqua complex (25 μL of 10 mM solution in MeOH, 10 mol-%) was added and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. Benzaldehyde (25 μL of 100 mM in DMSO, 2.5 μmol) and methylisocyanacetate (30 μL of 100 mM solution in DMSO, 3 μmol) were added and the mixture was stirred at room temperature. Aliquots (50 μL) of the reaction mixture were taken every 15 min, diluted in 950 μL water, and submitted to RP-HPLC analysis under isocratic conditions (Nucleosil C18 Htec 150 \times 4.6 mm, 40 % MeCN in H_2O at 1 mL/min, detection at 254 nm). After 3.5 h, the reaction medium was analyzed by RP-HPLC under gradient conditions (Nucleosil C18 Htec 150 \times 4.6 mm, 5–100 % MeCN in H_2O in 40 min at 1 mL/min, detection at 254 nm) to determine the *dr*. Then the aqueous solution was extracted with diisopropylether (2×0.9 mL). The organic phase was evaporated to dryness; the residue was dissolved in hexane/2-propanol 1:1 (150 μL) and analyzed by chiral HPLC (Kromasil 5-cellucoat, hexane/2-propanol 98:2 for 19 min, then to 96:4 in 11 min at 1 mL/min) to determine the enantiomeric ratio.

Supporting Information (see footnote on the first page of this article): Details of experimental procedures, computational details, NMR and CD spectra, as well as kinetic studies, can be found in the supporting information.

Acknowledgments

This work was financially supported by the LabEx MiChem. part of French state funds, managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) within the Investissements d'Avenir programme under reference ANR-11-IDEX-0004-02 and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) project Artzymes (grant number ANR-11-BS07-027-01).

Keywords: Palladium · β -Lactoglobulin · Docking · Aldol reactions · Metalloenzymes

- [1] J. Bos, G. Roelfes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 135–143.
- [2] M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306–307.
- [3] a) J. Steinreiber, T. R. Ward, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 751–766; b) F. Rosati, G. Roelfes, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 916–927; c) I. D. Petrik, J. Liu, Y. Lu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 67–75.
- [4] a) M. Durrenberger, T. R. Ward, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 99–106; b) J. C. Lewis, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2954–2975.
- [5] a) C. Letondor, N. Humbert, T. R. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 4683–4887; b) F. W. Monnard, E. S. Nogueira, T. Heinisch, T. Schirmer, T. R. Ward, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3269–3274; c) M. Skander, N. Humbert, J. Collot, J. Gradinaru, G. Klein, A. Loosli, J. Sauser, A. Zocchi, F. Gilardoni, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411–14418; d) M. Pellizzoni, G. Facchetti, R. Gandolfi, M. Fuse, A. Contini, I. Rimoldi, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1665–1670.
- [6] M. Allard, C. Dupont, V. Munoz Robles, N. Doucet, A. Lledos, J.-D. Marchal, A. Urvoas, J.-P. Mahy, R. Ricoux, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 240–251.
- [7] a) A. Pordea, M. Creus, J. Panek, C. Duboc, D. Mathis, M. Novic, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8085–8088; b) A. Pordea, D. Mathis, T. R. Ward, *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 930–936; c) R. Ricoux, M. Allard, R. Dubuc, C. Dupont, J. D. Marechal, J. P. Mahy, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3208–3211; d) L. Rondot, E. Girgenti, F. Oddon, C. Marchi-Delapierre, A. Jorge-Robin, S. Menage, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2016**, *416*, 20–28; e) J. Tang, F. P. Huang, Y. Wei, H. D. Bian, W. Zhang, H. Liang, *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 8061–8072; f) J. L. Zhang, D. K. Garner, L. Liang, D. A. Barrios, Y. Lu, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7481–7489; g) J. L. Zhang, D. K. Garner, L. Liang, Q. Chen, Y. Lu, *Chem. Commun.* **2008**, 1665–1667.
- [8] T. K. Hyster, L. Knorr, T. R. Ward, T. Rovis, *Science* **2012**, *338*, 500–503.
- [9] a) R. P. Megens, G. Roelfes, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6366–6368; b) D. Coquiere, J. Bos, J. Beld, G. Roelfes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5159–5162; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5261; c) Y. Li, C. Wang, G. Jia, S. Lu, C. Li, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 6585–6590.
- [10] a) P. J. Deuss, G. Popa, A. M. Z. Slawin, W. Laan, P. C. J. Kamer, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1184–1191; b) J. Bos, F. Fusetti, A. J. M. Driessen, G. Roelfes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7472–7475; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7590; c) W. Ghattas, L. Cotchico-Alonso, J. D. Marechal, A. Urvoas, M. Rousseau, J. P. Mahy, R. Ricoux, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 433–440; d) T. Himiyama, D. F. Sauer, A. Onoda, T. P. Spaniol, J. Okuda, T. Hayashi, *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *158*, 55–61.
- [11] V. Munoz Robles, E. Ortega-Carrasco, L. Alonso-Cotchico, J. Rodriguez-Guerra, A. Lledos, J.-D. Marechal, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 2469–2480.
- [12] P. J. Deuss, R. den Heeten, W. Laan, P. C. J. Kamer, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4680–4698.
- [13] a) A. Chevalley, M. V. Cherrier, J. C. Fontecilla-Camps, M. Ghasemi, M. Salmain, *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 5482–5489; b) A. Chevalley, M. Salmain, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11984–11986.
- [14] a) C. A. Kruihof, M. A. Casado, G. Guillena, M. R. Egmond, A. van de Kerckhof, A. J. R. Heck, R. J. M. Klein Gebbink, G. van Koten, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6869–6877; b) C. A. Kruihof, H. P. Dijkstra, M. Lutz, A. L. Spek, M. R. Egmond, R. J. M. Klein Gebbink, G. van Koten, *Eur. J. Inorg. Chem.*

- 2008, 4425–4432; c) L. Rutten, B. Wieczorek, J. Mannie, C. A. Kruithof, H. P. Dijkstra, M. R. Egmond, M. Lutz, R. J. M. Klein Gebbink, P. Gros, G. van Koten, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4270–4280; d) B. Wieczorek, H. P. Dijkstra, M. R. Egmond, R. J. M. Klein Gebbink, G. van Koten, *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 812–822.
- [15] M. Filice, O. Romero, A. Aires, J. M. Guisan, A. Rumbero, J. M. Palomo, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 2687–2696.
- [16] W. Laan, B. K. Munoz, R. den Heeten, P. C. J. Kamer, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1236–1239.
- [17] S. Abe, J. Niemeyer, M. Abe, Y. Takezawa, T. Ueno, T. Hikage, G. Erker, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10512–10514.
- [18] a) J. Pierron, C. Malan, M. Creus, J. Gradinaru, I. Hafner, A. Ivanova, A. Sardo, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 701–705; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 713; b) A. Chatterjee, H. Mallin, J. Klehr, J. Vallapurackal, A. D. Finke, L. Vera, M. Marsh, T. R. Ward, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 673–677.
- [19] N. Selander, K. J. Szabó, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2048–2076.
- [20] a) J. Zheng, S. Liu, B.-W. Jiang, T. B. Marder, Z. Yang, *Can. J. Chem.* **2012**, *90*, 138–144; b) D. E. Bergbreiter, P. L. Osburn, Y.-S. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9531–9538.
- [21] A. R. Katritzky, H.-Y. He, K. Suzuki, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8210.
- [22] P. Steenwinkel, R. A. Gossage, G. van Koten, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 759–762.
- [23] B. Soro, S. Stoccoro, G. Minghetti, A. Zucca, M. A. Cinellu, S. Gladiali, M. Manassero, M. Sansoni, *Organometallics* **2005**, *24*, 53–61.
- [24] A. Arnaiz, J. V. Cuevas, G. Garcia-Herbosa, A. Carbayo, J. A. Casares, E. Gutierrez-Puebla, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 2581.
- [25] C. Hawkins, J. A. Palmer, *Coord. Chem. Rev.* **1982**, *44*, 1.
- [26] a) G. Kontopidis, C. Holt, L. Sawyer, *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 785–796; b) S. Le Maux, S. Bouhallab, L. Gliblin, A. Brodkorb, T. Crogenec, *Dairy Sci. Technol.* **2014**, *94*, 409–426.
- [27] A. Taheri-Kafrani, Y. Choiset, D. A. Faizullin, Y. F. Zuev, V. V. Bezuglov, J.-M. Chobert, A.-K. Bordbar, T. Haertle, *Biopolymers* **2011**, *95*, 871–880.
- [28] F. Zsila, T. Imre, P. T. Szabo, Z. Bikadi, M. Simonyi, *FEBS Lett.* **2002**, *520*, 81–87.
- [29] a) O. Nicolotti, I. Giangreco, T. F. Miscioscia, A. Carotti, *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2290–2302; b) O. Nicolotti, T. F. Miscioscia, A. Carotti, F. Leonetti, A. Carotti, *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 1211–1226; c) D. Plewczynski, M. Łaźniewski, R. Augustyniak, K. Ginalski, *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 742–755.
- [30] M. V. Cherrier, S. Engilberge, P. Amara, A. Chevalley, M. Salmain, J. C. Fontecilla-Camps, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 3596–3600.
- [31] A. Divsalar, A. A. Saboury, H. Mansoori-Torshizi, F. Ahmad, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 3639–3647.
- [32] a) H. P. Dijkstra, M. Q. Slagt, A. McDonald, C. A. Kruithof, R. Kreiter, A. M. Mills, M. Lutz, A. L. Spek, W. Klopper, G. P. M. van Klink, G. van Koten, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 830–838; b) G. Guillena, G. Rodriguez, G. van Koten, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3895–3898; c) N. C. Mehendale, C. Bezemer, C. A. van Walree, R. J. M. Klein Gebbink, G. van Koten, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2006**, *257*, 167–175; d) M. Q. Slagt, D. A. P. van Zwielen, A. Moerkerk, R. J. M. Klein Gebbink, G. van Koten, *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 2275–2282; e) B. Soro, S. Stoccoro, G. Minghetti, A. Zucca, M. A. Cinellu, M. Manassero, S. Gladiali, *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 1879–1888; f) R. van de Coevering, M. Kuil, R. J. M. Klein Gebbink, G. van Koten, *Chem. Commun.* **2002**, 1636–1637; g) S. Gosiewska, S. Herreras Martinez, M. Lutz, A. L. Spek, G. van Koten, R. J. M. Klein Gebbink, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 4600–3607; h) S. Gosiewska, S. Martinez Herreras, M. Lutz, A. L. Spek, R. W. A. Havenith, G. P. M. van Klink, G. van Koten, R. J. M. Klein Gebbink, *Organometallics* **2008**, *27*, 2549–2559.
- [33] D. M. Grove, G. Van Koten, J. N. Louwen, J. G. Noltes, A. L. Spek, H. J. C. Ubbels, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6609–6616.
- [34] F. Schwizer, Y. Okamoto, T. Heinisch, Y. Gu, M. M. Pellizoni, V. Lebrun, R. Reuter, V. Köhler, J. C. Lewis, T. R. Ward, *Chem. Rev.*, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00014>.

Received: April 6, 2017

Résumé- *Ancrage supramoléculaire de complexes organométalliques dans la bêta-lactoglobuline pour la catalyse asymétrique dans l'eau. Effet des ligands prochiraux hémilabiles.*

Ce travail de thèse est consacré à la conception de métalloenzymes artificielles. Un tel concept permet de combiner les avantages des catalyseurs enzymatiques et organométalliques, tels que la sélectivité catalytique élevée et l'efficacité des systèmes enzymatiques et la large portée de substrats des catalyseurs des métaux de transition. Notre approche repose sur l'utilisation de complexes de métaux de transition avec un ligand prochiral hémilabile, qui une fois insérés dans la protéine hôte sera forcé d'adopter une configuration spécifique. La chiralité sera ainsi amenée au plus près du centre métallique et permettra d'augmenter l'énantioselectivité des réactions catalysées. Dans cette thèse, nous rapportons la synthèse de nouveaux complexes de palladium à ligands pinces NCN hémilabiles prochiraux et l'étude de leurs propriétés structurales. De plus, l'ancrage supramoléculaire de ces complexes dans la β -lactoglobuline (β -LG) bovine a été étudié expérimentalement et théoriquement par modélisation moléculaire. Ces constructions ont montré une activité catalytique dans la condensation d'aldol dans l'eau, et permettent d'obtenir, dans certains cas, le produit *Cis*. Cette diastéréosélectivité inhabituelle résulte de la seconde sphère de coordination apportée par l'hôte protéique. Dans une deuxième partie, on rapporte la synthèse de nouveaux complexes semi-sandwich de ruthénium avec des ligands β -aminothioéther hémilabiles, ainsi que l'étude de leur insertion dans la protéine. Les hybrides catalysent l'hydrogénation par transfert d'arylcétones avec une énantiosélectivité élevée. L'amélioration de la sélectivité a été attribuée au transfert de chiralité de la protéine vers le complexe et à son tour vers le produit de réaction.

Mot-clés : métalloenzyme artificielle, ligand hémilabile, palladium, ruthénium, condensation d'aldol, hydrogénation par transfert, transfert de chiralité.

Abstract- *Supramolecular anchoring of organometallic complexes in beta-lactoglobulin for asymmetric catalysis in water. Effect of prochiral hemilabile ligands.*

This PhD work focused on the development of artificial metalloenzymes. Such a concept allows to combine typical advantages of both enzymatic and organometallic catalysts, such as high catalytic selectivity and efficiency of enzymatic systems and wide substrate scope of transition metals catalysts.

Our approach consists in the utilization of transition metal complexes with a prochiral hemilabile ligand, once embedded within the protein host, could be forced to adopt a specific stereoconfiguration. This would in turn make possible to bring the chirality centers closer to the catalytic metal center and, therefore, to increase the enantioselectivity of catalyzed reactions. In this thesis, we report the synthesis of new palladium complexes of prochiral hemilabile NCN pincer ligands and the study of their structural properties. Furthermore, the supramolecular anchoring of these complexes to bovine β -lactoglobulin (β -LG) was studied both experimentally and theoretically by computational calculation. These constructs were shown to catalyze aldol condensation reactions in aqueous media, affording, in some cases, the less-favorable *cis* product. This unusual diastereoselectivity was ensued by the second sphere of coordination brought by the protein host. In a second part, the synthesis of new half sandwich ruthenium complexes of prochiral hemilabile β -aminothioether ligands is reported as well as the study of their insertion in the protein. The hybrids catalyzed the transfer hydrogenation of arylketones with high enantioselectivity. The enhancement of selectivity was attributed to chirality transfer from the protein to the complex and in turn to reaction product.

Keywords : artificial metalloenzyme, hemilabile ligand, palladium, ruthenium, aldol condensation, transfer hydrogenation, chirality transfer.