



**HAL**  
open science

# Catalyse hybride assistée par criblage à haut débit et intelligence artificielle : vers de nouveaux matériaux multi-catalytiques pour la valorisation de la biomasse

Egon Heuson

► **To cite this version:**

Egon Heuson. Catalyse hybride assistée par criblage à haut débit et intelligence artificielle : vers de nouveaux matériaux multi-catalytiques pour la valorisation de la biomasse. Catalyse. Université de Lille, 2023. tel-04695002

**HAL Id: tel-04695002**

**<https://hal.univ-lille.fr/tel-04695002v1>**

Submitted on 11 Sep 2024

**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.

**UNIVERSITE DE LILLE**  
**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA MATIÈRE, DU RAYONNEMENT, ET DE**  
**L'ENVIRONNEMENT**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention de*

**L'habilitation à diriger des recherches**

*Spécialité : Chimie organique, minérale et industrielle*

*Laboratoire : Unité de Catalyse et Chimie du Solide*

*Par*

**Egon HEUSON**

Soutenance le 10 octobre 2023

**Catalyse hybride assistée par criblage à haut débit et intelligence artificielle : vers de nouveaux matériaux multi-catalytiques pour la valorisation de la biomasse**

Rapporteur·ice·s :

**Professeure Véronique Alphand**

Institut des Sciences Moléculaires de Marseille, Aix-Marseille Université

**Directrice de Recherche Vanessa Prévot**

Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Clermont-Auvergne

**Professeur Damien Debecker**

Institut de la Matière Condensée et des Nanosciences, Université Catholique de Louvain

Examineur·ice·s :

**Professeure Anne Zapparucha**

UMR8030 Génomique Métabolique, Universités Paris-Saclay-Evry

**Professeur Thierry Gefflaut**

Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Clermont-Auvergne

**Directrice de Recherche Véronique De Berardinis**

UMR8030 Génomique Métabolique, CEA

**Professeur Sébastien Paul**

Unité de Catalyse et Chimie du Solide, Centrale Lille

Garant :

**Professeur Franck Dumeignil**

Unité de Catalyse et Chimie du Solide, Université de Lille



*I dare do all that may become a man,  
who dares more is none.*

Macbeth, Acte 1, Scène VII



## Remerciements

Avant de commencer j'aimerais tout d'abord remercier les membres de mon jury qui me feront l'honneur de lire ce mémoire et de juger mon travail. J'espère que vous me trouverez digne de l'habilitation à diriger des recherches, et je vous remercie par avance pour votre intérêt et votre patience quant à cette lecture et lors de la soutenance qui suivra, à laquelle j'ai hâte d'échanger avec vous.

Je dédie maintenant ce manuscrit à mes étudiant·e·s passé·e·s, présent·e·s et futur·e·s. C'est à vous que je dois en premier lieu ma recherche. A l'issue de ma thèse, j'étais persuadé que la science représentait l'élément central de la vie d'un chercheur. Il n'en est rien. La réalité c'est que la science ne peut se faire sans vous, l'armée de jeunes chercheurs et chercheuses, qui vous dédiez corps et âme à nos projets, aussi farfelus soient-ils. Vous accompagner au long de votre apprentissage est à n'en point douter la tâche la plus complexe, la plus importante, mais surtout la plus gratifiante qui nous incombe. Je ne compte plus les moments de doutes et de questionnement que j'ai eu à vos côtés durant ces 7 dernières années. Mais je me souviens surtout de ces intenses discussions derrière l'HPLC, le MALDI ou à la RMN, en attendant ensemble que le produit tant espéré veuille bien daigner se montrer, de la joie de lire la fierté dans vos yeux à l'acceptation de votre première publication (et du désespoir des nombreux refus qui l'ont précédée), ou encore de tous ces moments passés à discuter de tout autre chose que de science, souvent à bâtons rompus. Aussi j'aimerais commencer par vous remercier vous, Estelle, Antoine, Eléonore, Juan, Violette, Abel et Oumaima, pour tout ce que vous m'avez et continuez encore à m'apporter. J'aimerais également remercier Richard et Lucas, qui viennent de signer pour une thèse avec moi, fous que vous êtes, et je ferai en sorte de m'en montrer digne. Je suis également très reconnaissant à vous étudiant·e·s en stage, qui avez aidé à faire avancer les projets de ces intrépides doctorant·e·s, que vous soyez passés en coup de vent, ou que vous soyez restés un peu plus longtemps. Mes amitiés plus particulières à Neha, Anika, Nastassia, Laurine, Anaëlle, Théo, Lucas et Guillaume qui avez tout donné, et que j'ai la chance de recroiser de temps en temps. Une pensée toute particulière enfin à Roxane, Clément, et Jonathan, vous qui avez toujours pris le relai pour donner un coup de main à nos jeunes. Je vous souhaite le meilleur pour votre carrière.

J'aimerais également exprimer toute ma gratitude à mes collègues. A ceux de BioEcoAgro tout d'abord, qui m'ont accueilli dans cette grande famille qu'est l'Institut Charles Viollette, et qui m'ont tout de suite fait confiance en me confiant leurs manips à haut débit, mais également les étudiant·e·s qui vont avec. Nous avons monté et réalisé tellement de projets que je ne saurais les compter. J'aimerais en particulier remercier Ali, Benoît, Caroline et Caroline, Cédric, Céline, Christophe, Corinne, David, Didier, François et François, Guillaume, Marjorie, Matthieu, Jean-Louis, Krasimir, Loubna, Pascal, Philippe, Rozenn, Sevser, Simon, Thierry, Valérie, et plus encore Barbara, avec qui j'ai adoré planifier, négocier, échanger, et construire ces nombreux succès qui ont parsemé ces 5 années passées ensemble. Un remerciement tout particulier à vous Rénato et Vincent, mes partenaires de toujours. On s'est quelques fois bien grattés la tête, mais je pense qu'on aura accompli quelques jolies victoires, et ce sera un réel plaisir de continuer cette aventure avec vous ! De chaleureux remerciements à présent à mes nouveaux collègues de l'UCCS avec qui je démarre tout juste ma nouvelle carrière. A vous Andrei, Bastien, Benjamin, Christophe, Fabio, Frédérique, Mathieu, Michèle, Mickaël, Nicolas, Philippe, Thierry, et Véronique, qui me faites confiance pour développer ces nouveaux projets excitants. Un remerciement plus particulier à Axel, Jérémy, Vitaly et Yohann qui m'ont conseillé, accompagné et soutenu tout au long de mes nombreuses tentatives au concours de chargé de recherche CNRS. Enfin mon amitié à Till qui a obtenu son HDR très récemment et qui a été de très bon conseil pour la rédaction de celle-ci, ainsi que pour le parcours du combattant administratif qui l'accompagne. Je remercie également mes collègues de France et de Navarre, avec lesquels je travaille

également au quotidien, dont certain·e·s depuis un bon nombre d'années maintenant. Merci à vous Aurélie, Carine, Clémence, Christine, Louis, Mark, Muriel, Stefan et Stefan, Tao, et Thierry pour votre aide, vos conseils, votre temps et votre confiance.

Une pensée également à mes collègues des services administratifs, et en particulier à Cathy et Sandrine. Sans votre aide je serais déjà noyé dans les méandres de l'administration. Mes amitiés sincères aussi à Chiara et Thomas, du service de montage de projets de l'Université de Lille, ainsi qu'à Anne-Valentine et Virginie de la cellule innovation et valorisation de Centrale. Tant de moments passés à finaliser les projets, mettre en place des contrats, comprendre les règles de financement, et à négocier avec les partenaires. Je n'y serais jamais arrivé sans vous, vous qui m'avez supporté, souvent, et conseillé, toujours. Un remerciement spécial enfin à mes collègues de Centrale Lille, Arnaud, Christophe, Fabien, Nicolas, Thomas, Xavier, toujours là pour m'aider à souder une résistance, imprimer une pièce en 3D, ouvrir un accès réseau ou réparer un ordinateur, ainsi qu'à Pascal et Philippe avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à monter et donner des cours. Surtout toute mon amitié la plus sincère à Farid et Laurent, en remerciement pour ces innombrables heures passées à parler Linux, configurer Proxmox, choisir entre RAID et ZFS, me réprimander sur mon manque de rigueur et l'utilisation de Docker, mais également pour leur soutien indéfectible sur des choix de carrière ou des questions existentielles. Vous êtes formidables les amis.

J'aimerais terminer avec quelques âmes extraordinaires, que j'ai l'honneur et le privilège de côtoyer au quotidien, et qui me donnent l'envie de me lever tous les matins. Je commencerai bien évidemment par ma famille de REALCAT, Joelle, Ophélie, Johann et Zohra, à qui je ne saurais au combien dire merci, tellement ils·elles m'ont soutenu, aidé, et supporté toutes ces années. Une pensée toute particulière à Svetlana, ma *grande soeur*, et Quentin, mon *petit frère* ingénieur·e·s. Je serai toujours là pour vous comme vous avez su l'être pour moi, et j'espère que vous aurez pris autant de plaisir que moi à bricoler, farfouiller, configurer, gérer, modifier, nettoyer et bichonner jours et nuits notre bébé automatisé. REALCAT un jour, REALCAT toujours !!! Une pensée également à Franck, mon garant d'HDR et qui me pousse à aspirer à de plus grandes choses. Même s'il est devenu difficile de rivaliser avec toutes tes occupations pour arriver à te voir, ton enthousiasme, ta rigueur et ton ambition sont un exemple à suivre au quotidien. Mon amitié profonde également à deux chercheuses fantastiques, Véronique et Anne, qui ont été pour moi bien plus que des collègues. Vous m'avez accompagné au quotidien depuis plus de 5 ans, tout particulièrement dans l'enfer qu'est la recherche d'un poste académique, et m'avez toujours appris à me relever et à ne pas baisser les bras, même quand tout semblait perdu. Enfin, et surtout, merci à toi Sébastien. Tu m'as pris sous ton aile dès mon arrivée, tu m'as défendu quand j'en avais besoin, m'a poussé à me dépasser, à garder espoir quand celui-ci se faisait mince, garder la rigueur lorsque la pression se faisait forte. Parmi les nombreux conseils que tu m'as donnés, je retiendrai en particulier ta tentative de m'enseigner la diplomatie, qualité ô combien difficile à acquérir et pourtant nécessaire à notre métier. Bon, ce n'est pas encore tout à fait cela, mais je ne désespère pas d'arriver un jour à ta hauteur.

Mon amour enfin à ma famille, mes parents, Marc et Geneviève, mon frangin, Pablo, ma Marraine, Nèle, mes grand-mères, Odette et Jeanine, mes oncles et tantes, Lionel et Patricia, mais également à ma belle-famille, Jeannine, Jean-Pierre, Lucie, Adrien, Léonie et Romy, à vous qui me soutenez.

Et puis à toi, Audrey. Je n'ai de mot pour te dire combien je t'aime et je te remercie. Tu m'as soutenu de manière indéfectible jusque-là, dans tous les instants, jusqu'aux dernières minutes de l'écriture de ce manuscrit. Voilà, c'est fait pour moi, en grande partie grâce à ta minutieuse relecture. C'est à ton tour maintenant de coucher sur le papier ces idées brillantes que tu développes. Sache que je serai à tes côtés tout au long de ce chemin, comme pour le reste de notre vie. *Je t'aime dans toutes les langues du monde, Umugwaneza.*

## Sommaire

<b>TABLE DES FIGURES .....</b>	<b>8</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>14</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>18</b>
<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>19</b>
<b>Cursus et postes .....</b>	<b>19</b>
<b>Production scientifique.....</b>	<b>19</b>
Synthèse .....	19
Articles publiés dans des journaux à comité de lecture .....	19
Publications en pre-print .....	21
Autres publications (proceedings, actes de colloques, chapitres d'ouvrages,...) .....	21
Brevets et déclarations d'inventions .....	22
Communications orales .....	22
Communications par affiche .....	23
Séminaires invités .....	23
<b>Encadrements scientifiques .....</b>	<b>24</b>
Doctorant·e·s (9) .....	24
Chercheur·se·s Post-Doctoraux (5).....	25
Stagiaires (19) .....	25
<b>Participation à des jurys de soutenances et comités de suivi individuel de thèse .....</b>	<b>27</b>
Jurys de thèse .....	27
Comités de suivi individuel de thèse (CSI).....	27
<b>Activités d'enseignement.....</b>	<b>27</b>
<b>Projets financés .....</b>	<b>28</b>
<b>Organisation de congrès.....</b>	<b>29</b>
Congrès à portée internationale.....	29
Congrès à portée nationale .....	29
<b>Responsabilités et actions pour la communauté scientifique .....</b>	<b>29</b>
<b>Prix et distinctions .....</b>	<b>29</b>
<b>Vulgarisation scientifique .....</b>	<b>29</b>
<b>Autres activités.....</b>	<b>30</b>
<b>RESUME DE MES TRAVAUX PASSES ET PRESENTS .....</b>	<b>31</b>
<b><i>Axe 1 : Recherche de nouvelles enzymes et applications en biocatalyse.....</i></b>	<b><i>31</i></b>
<b>Thématique 1.1 : recherche de nouvelles transaminases issues de la biodiversité pour la synthèse d'amines chirales... 31</b>	<b>31</b>
Synthèse organique des cétoacides et cétones utilisées pour le criblage des banques de transaminases.....	32
Mise au point de nouveaux tests spectrophotométriques universels pour le criblage de transaminases .....	33
Conception et production de 3 banques de transaminases regroupant plus de 1500 nouvelles séquences issues de la biodiversité .....	34
Criblage automatisé des banques de transaminases avec les tests $\beta$ AS .....	35
Application des nouvelles transaminases pour la synthèse d'acides aminés non naturels à haute valeur ajoutée.....	37
<b>Thématique 1.2 : développement de cascades enzymatiques pour la synthèse de nouveaux composés à haute valeur ajoutée.....</b>	<b>38</b>
Boucles enzymatiques aldolases-transaminases autonomes pour la synthèse d' $\alpha$ -aminoacides $\gamma$ -hydroxylés.....	38
Recherche de sérine-transaminases thermostables et développement de cascades enzymatiques transcétolases-transaminases à haute température pour la synthèse de cétooses rares de configuration (3S, 4S) .....	40
<b>Thématique 1.3 : étude d'autres familles d'enzymes et applications en biocatalyse.....</b>	<b>42</b>
Utilisation de lipases commerciales pour la valorisation de sous-produits de transformation de la biomasse.....	42
<b><i>Axe 2 : Nouvelles stratégies à haut débit pour la valorisation de la biomasse et l'exploitation de souches microbiennes.....</i></b>	<b><i>49</i></b>
<b>Thématique 2.1 : fermentations et tests enzymatiques à haut débit pour la recherche de nouvelles d'enzymes de dégradation de la paroi végétale pour la dépolymérisation de la biomasse lignocellulosique .....</b>	<b>49</b>



Méthodologie de criblage à haut débit de champignons filamenteux en présence de charge réelle de biomasse .....	51
Méthode automatisée à très haut débit pour l'identification de souches bactériennes et fongiques issues de l'environnement .....	52
Développement d'un éventail de méthodes analytiques pour la caractérisation des activités enzymatiques de dégradation de la lignocellulose.....	54
Combinaison rationnelle automatisée de cocktails enzymatique pour l'optimisation de leur capacité catalytique. ....	56
<b>Thématique 2.2 : stratégies de criblage à haut débit de fermentations pour la production de molécules bioactives .....</b>	<b>58</b>
Production de nouvelles molécules antimicrobiennes provenant de cocultures mettant en œuvre des couples bactérie+champignon, pour une application en biocontrôle .....	59
Production et criblage de lipopeptides pour leurs propriétés bio-surfactantes et antimicrobiennes. ....	65
<b>Thématique 2.3 : autres stratégies de criblage pour l'étude des activités biologiques de molécules biosourcées .....</b>	<b>69</b>
<b>Thématique 2.4 : nouveaux systèmes de diagnostics à haut débit pour la détection de maladie et la recherche de nouveaux médicaments .....</b>	<b>71</b>
<b>Axe 3 : Développement du concept de catalyse hybride en synthèse : application à la valorisation de molécules biosourcées .....</b>	<b>74</b>
<b>Introduction : les systèmes multi-catalytiques en synthèse, leur abondance dans les domaines de la chimie et de la biologie, et les verrous qu'il reste encore à lever .....</b>	<b>74</b>
Terminologie des procédés multi-catalytiques.....	75
Nomenclature des différents types de réactions impliquées au sein des procédés multi-catalytiques.....	79
Les systèmes multi-catalytiques en chimie et biologie : abondance et limites .....	87
Les différentes nuances de catalyse hybride .....	91
<b>Thématique 3.1 : synthèse de dérivés du furfural biosourcés par combinaison d'enzymes et de catalyseurs chimiques</b>	<b>97</b>
Synthèse du 5-hydroxyméthylfurfural directement à partir de glucose selon un procédé hybride en two-pots/one-step .....	97
Synthèse de furfurylamines par catalyse hybride : conversion du 5-hydroxyméthylfurfural en acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique selon un procédé en one-pot/two-steps .....	100
Valorisation de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique par biocatalyse et catalyse hybride pour la production de nouveaux biosurfactants.....	105
<b>Thématique 3.2 : essais préliminaires de conception de matériaux multi-catalytiques hybrides (MMCH) à base de Metal-Organic Frameworks (MOF).....</b>	<b>107</b>
Intérêt des matériaux multi-catalytiques hybrides et choix des metal-organic-frameworks pour leur conception.....	107
Synthèse de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique par (co)immobilisation de transaminases et de nanoparticules d'or sur un UiO-66-NH <sub>2</sub> .....	115
Synthèse à haut débit de l'UiO-66 et de ses dérivés .....	119
<b>Axe 4 : Conception d'outils informatique et d'algorithmes de machine learning pour la prédiction de l'activité d'enzymes.....</b>	<b>126</b>
<b>Thématique 4.1 : utilisation du machine learning au service de la prédiction de l'activité d'enzymes.....</b>	<b>126</b>
Introduction : utilité du machine learning pour la prédiction de biocatalyseurs.....	126
Prédiction de l'activité de transaminases à l'aide d'un modèle de machine learning entraîné sur des données de criblages à haut débit et des complexes 3D enzyme-substrat obtenus par docking automatique .....	136
<b>PROJET DE RECHERCHE .....</b>	<b>149</b>
<b>Catalyse hybride assistée par criblage à haut débit et intelligence artificielle : vers de nouveaux matériaux multi-catalytiques pour la valorisation de la biomasse.....</b>	<b>149</b>
Conception de nouvelles voies de synthèse hybrides pour la valorisation de composés issus de la dégradation de la lignocellulose .....	149
Conception de nouveaux matériaux multi-catalytiques hybrides à base de metal-organic frameworks de la famille des NU-100x .....	151
Prédiction de la capacité d'immobilisation d'enzymes sur des metal-organic frameworks et des interactions en découlant, par machine learning et criblage haut débit.....	157
Projets annexes liés ou non à mon activité de recherche principale .....	161
Participation au déploiement de la science ouverte et de la recherche participative.....	161
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>164</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>165</b>

## Table des figures

Figure 1 : Réaction de transamination. ....	31
Figure 2 : Liste des $\alpha$ -cétoacides et autres composés carbonylés utilisés durant ma thèse pour le criblage des nouvelles transaminases. Sont entourés en orangé ceux pour lesquels j'ai mis au point une nouvelle voie de synthèse. ....	32
Figure 3 : Utilisation d'un $\beta$ AS comme donneur pour les réactions de transamination. ....	33
Figure 4 : Tests universels pour les transaminases basés sur l'utilisation d'un donneur de type $\beta$ AS pour le déplacement de l'équilibre réactionnel et la détection spectrophotométrique de l'activité des enzymes. ....	34
Figure 5 : Stratégie d'exploration génomique des bases de données protéiques internationales, basée sur le postulat qu'une homologie de séquence entraîne une homologie d'activité catalytique. ....	35
Figure 6 : Étapes effectuées automatiquement pour le criblage de la banque de transaminase, de la préparation des tests avec le robot TECAN, jusqu'au programme informatique pour le traitement des données. ....	36
Figure 7 : Procédé de déplacement d'équilibre utilisant la glutamine comme donneur d'amine pour la synthèse d'acides aminés. ....	37
Figure 8 : Synthèse de la <i>L</i> -/D-Hfe, de la <i>L</i> -/D-Hal et la <i>L</i> -Tle à l'aide de deux transaminases découvertes durant ma thèse utilisant la glutamine comme donneur d'amine pour le déplacement d'équilibre. ....	38
Figure 9 : Synthèse de $\gamma$ -hydroxycétoacides par aldolisation entre le pyruvate et un aldéhyde grâce à une PyrAL. ...	39
Figure 10 : Boucle AL-TA permettant la synthèse de <i>L</i> -syn-HGlu ou de <i>L</i> -anti-HGlu grâce à partir de <i>L</i> -aspartate et glyoxylate, catalysée par la combinaison d'une PyrAL et de l'AspTA. ....	39
Figure 11 : Synthèse de des 4 diastéréoisomères de la DHNV à l'aide d'une boucle AL-TA utilisant la <i>L</i> - ou <i>D</i> -alanine et le glycolaldéhyde comme substrats de départ. ....	40
Figure 12 : Couplage de la TK <sub>gst</sub> et d'une SerTA pour la synthèse d'un cétose de configuration (3 <i>S</i> , 4 <i>S</i> ) par génération <i>in situ</i> du HPA. ....	40
Figure 13 : Test de criblage au WST-1 permettant de mesurer l'activité de transaminases pour la sérine. ....	41
Figure 14 : Couplage de la TA A1HUC4 issue de la banque TAM(A) avec la TK <sub>gst</sub> lors d'une réaction à 60 °C aboutissant à la synthèse du <i>L</i> -érythrose. ....	41
Figure 15 : Squelette guaianolide et structure des principales LST non conjuguées présentes dans la racine de chicorée. ....	44
Figure 16 : Exemples de dérivés acylés de l'alcool périllyque trouvés dans la littérature. NEO218 et NEO212 ont été préparés par des procédés non biocatalytiques. ....	45
Figure 17 : Concept de synthèse de la myrténylamine à partir du myrténol à l'aide d'une cascade enzymatique faisant intervenir un alcool déshydrogénase et une transaminase. ....	46
Figure 18 : Stratégie de couplage d'une lipase et d'une transaminase pour la synthèse du <i>L</i> -alaninate de (( <i>S</i> )-4-isopropylcyclohex-1-en-1-yl)méthyle à partir de l'alcool périllyque, de l'acide pyruvique et d'un donneur d'amine. ....	47
Figure 19 : Schéma simplifié de la composition de la paroi cellulaire des végétaux représentant l'enchevêtrement de la cellulose, de la lignine et de l'hémicellulose. ....	50
Figure 20 : Paille de blé broyée à deux granulométries (< 0,25 mm et < 1 mm) utilisée direction lors des fermentations pour simuler des conditions en milieu submergé, et cibler directement la production d'enzymes efficace contre cette biomasse. ....	52
Figure 21 : Vue du dessous d'une plaque de BioLector dans laquelle les puits de droite ont été remplis de milieu minimum supplémentés avec 1 % m/m de paille de blé broyée (1 mm), puis inoculés avec des spores de champignons filamenteux pour une incubation dans le BioLector Pro. ....	52
Figure 22 : Représentation 3D de l'adaptateur pour plaque MALDI compatible avec les robots de la marque Beckman Coulter (Biomek NX <sup>p</sup> , FX <sup>p</sup> , i5 et i7) pour le dépôt automatisé d'échantillons. ....	53
Figure 23 : Photo du dépôt de 384 échantillons de 1,5 $\mu$ L sur une plaque MALDI à l'aide d'un robot de pipetage Biomek FX <sup>p</sup> . ....	53
Figure 24 : Approche automatisée faisant appel à un panel de techniques analytiques complémentaires pour la caractérisation à la fois des activités enzymatiques présentes dans les cocktails enzymatiques, et de la capacité de ces derniers à dépolymériser de manière globale la biomasse lignocellulosique. ....	55
Figure 25 : Exemple de réacteur à piston de faible dimension pour une implantation auprès de petites collectivités. ....	56
Figure 26 : Stratégie globale de combinaisons de cocktails enzymatiques générés à partir d'un criblage de souches fongiques sur différentes biomasses, pour l'évaluation à haut débit des meilleurs mélanges. ....	57

Figure 27 : Photo d'une plaque de criblage obtenue après 24h d'incubation en présence de mélanges de 3 surnageants de culture fongique en différentes proportions suivant le puits. Le niveau de coloration corrèle la capacité du nouveau cocktail enzymatique à dégrader la biomasse utilisée pour la production du substrat ICB utilisé lors du test (paille de blé).....	57
Figure 28 : Stratégie de mise en œuvre de cocultures bactéries+champignons pour la production et l'identification de nouveaux antifongiques. ....	61
Figure 29 : Courbes obtenues pour les monocultures (A) de 6 bactéries et champignons dans le milieu NB, et pour les cocultures (B) dans du NB impliquant <i>Pseudomonas syringae</i> et les 5 champignons criblés. ....	62
Figure 30 : Vue du dessous d'une des plaques de BioLector obtenue après 100 h de fermentation (monoculture ou coculture) montrant la diversité des morphologies de croissance des souches bactériennes et fongiques. ....	62
Figure 31 : Exemple de test d'inhibition des surnageants issus des cocultures en BioLector contre <i>F. oxysporum</i> (à gauche) et <i>S. cerevisiae</i> , sur milieu gélosé. Les surnageants actifs sont entourés par un rectangle blanc.....	63
Figure 32 : Exemple d'halos d'inhibition obtenus contre <i>S. cerevisiae</i> après concentration par 20 des surnageants produits à partir des cocultures en erlenmeyers. ....	64
Figure 33 : Structures de l'auxine, de la desferrioxamine E et de la benarhine.....	65
Figure 34 : Stratégie de criblage d'échantillons bactériens issus de l'environnement pour la production de lipopeptides à l'aide du nouveau test fluorescent basé sur l'utilisation d'uranine et de chlorure de cétypyridinium. ....	67
Figure 35 : Stratégie de criblages de souches bactériennes isolées à partir de racines de Vétiver, pour leur capacité à produire des lipopeptides antimicrobiens, lesquels sont identifiés et leur action quantifiée à l'aide de tests d'inhibition et d'analyses en masse automatisés.....	68
Figure 36 : Crevette ( <i>Penaeus monodon</i> ) avant (à gauche) et après (à droite) l'apparition des « taches noires » liées au phénomène de mélanose.....	70
Figure 37 : Approche de quantification à haut débit d'insuline développée durant le projet Ins-Spect, combinant une méthode robotisée d'incubation de cellules pancréatiques murines en présence de médicaments potentiels (molécules organiques ARNsi) avec une analyse MALDI automatisée jusqu'au traitement des résultats. ....	72
Figure 38 : Schéma d'un procédé réactionnel multicatalytique en 2P2S. Le produit (P) de la première réaction est purifié avant de servir de substrat (S) pour la seconde réaction. ....	75
Figure 39 : Schéma d'un procédé réactionnel multi-catalytique en 1P1S. Les deux catalyseurs sont en présence dès le début de la réaction et travaillent de concert pour aboutir au produit final, souvent avec la mise en place d'effets de synergie. ....	76
Figure 40 : Schéma d'un procédé réactionnel multi-catalytique en 1P2S. Le second catalyseur est ajouté extemporanément, après que le premier catalyseur a effectué la première réaction.....	77
Figure 41 : Schéma de procédés réactionnels multi-catalytiques en 2P1S. À gauche, les deux catalyseurs sont séparés par une membrane solide (polymère, micelle, paroi cellulaire, etc.). À droite, les deux catalyseurs sont séparés par une membrane liquide (mélanges multiphasique, réacteurs séparés par un pont liquide, etc.). ....	78
Figure 42 : Schéma d'un procédé réactionnel multi-catalytique en 1P1S mettant en jeu un matériau combinant les différents sites actifs.....	79
Figure 43 : Schémas de réactions multi-catalytiques en domino ou cascade. Dans la réaction de gauche, le catalyseur n'est pas modifié et agit consécutivement sur différentes molécules. Dans la réaction de droite, le catalyseur est modifié par une première réaction avec un premier couple substrat/produit, puis est régénéré au travers de son action sur un second couple. ....	80
Figure 44 : Schémas de réactions multi-catalytiques en tandem combiné (en haut) et séquentiel (en bas). ....	81
Figure 45 : Schéma d'une réaction multi-catalytique en tandem parallèle.....	82
Figure 46 : Schémas de réactions multi-catalytiques en tandem cyclique. Les trois exemples du bas sont des variations du concept général (en haut) aboutissant à la formation de différents énantiomères purs, soit du substrat de départ, soit de nouveaux produits. ....	83
Figure 47 : Schéma de réaction multi-catalytique en tandem activé. ....	84
Figure 48 : Concept multi-catalytique couplant 4 réactions en tandems parallèles pour former un tandem séquentiel dans lequel les cofacteurs et donneurs d'amine sont régénérés à partir d'ammoniac en solution. ....	84
Figure 49 : Aperçu des différentes familles de matériaux chémo-catalytiques ainsi que des principaux matériaux qu'elles regroupent.....	89
Figure 50 : Différentes approches et objectifs pour la combinaison d'un catalyseur chimique et d'un catalyseur biologique.....	91
Figure 51 : Couplage d'une sorbitol déshydrogénase avec un complexe organométallique à l'iridium pour la conversion de <i>D</i> -sorbitol en <i>D</i> -fructose selon un procédé hybride générant du dihydrogène. ....	93

Figure 52 : Nombre de publications décrivant des réactions en catalyse hybride selon un procédé 1P1S (rouge) et 1P2S (bleu) entre les années 2000 et 2019. ....	94
Figure 53 : Exemple de précurseurs de polymères obtenus à partir du HMF.....	97
Figure 54 : Procédé bi-compartment tri-phasique permettant la production d'HMF à partir de glucose à travers un système catalytique hybride basé sur l'utilisation d'une glucose isomérase (GI) immobilisée et d'une résine sulfonique (H <sup>+</sup> ).....	98
Figure 55 : Schéma du réacteur triphasique visant la conversion de glucose en HMF par un procédé <i>two-pots/one-step</i> . ....	99
Figure 56 : Rendu 3D de la pale conçue pour le réacteur triphasique visant la conversion de glucose en HMF par un procédé 2P1S.....	100
Figure 57 : Molécules pouvant être obtenues à partir de 1) l'oxydation des groupements hydroxyle et carbonyle du HMF : le 2,5-dicarboxaldéhydefurane (DCAF), l'acide 5-hydroxyméthyl-2-furancarboxylique (HFCA), l'acide 5-aldéhyde-2-furancarboxylique (AFCA) & l'acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA) ; et 2) l'amination des dérivés carbonyles correspondants : le 5-hydroxyméthyl-2-aminométhylfuran (HMFA), le 5-aminométhyl-2-furancarboxaldéhyde (AMFA), l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) & la furan-2,5-diyldiméthanamine (FDMA)). ....	101
Figure 58 : Procédé catalytique hybride en <i>one-pot/two-steps</i> pour la synthèse de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) à partir du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) combinant un catalyseur hétérogène métallique d'oxydation et une transaminase immobilisée.....	102
Figure 59 : Concentrations en HMF, HFCA, AFCA, FDCA, et AMFC mesurées tout au long de la réaction hybride en <i>one-pot/two-steps</i> combinant du Pt/SiO <sub>2</sub> et la Cv-TA/EziG <sup>TM</sup> OPAL.....	103
Figure 60: Couverture du numéro du volume 13 de la revue ChemCatChem de janvier 2021 décrivant la combinaison de nanoparticules de platine immobilisées sur silice avec une transaminase pour la synthèse d'AMFC à partir d'HMF. ....	103
Figure 61 : Concept de procédé catalytique hybride en <i>one-pot/one-step</i> pour la synthèse de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) à partir du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) combinant successivement une transaminase immobilisée et un catalyseur hétérogène métallique d'oxydation.....	105
Figure 62 : Nouvelle voie hybride pour la formation d'amides de l'AMFC par couplage d'acétylCoA ligases et de nanoparticules métalliques supportées.....	106
Figure 63 : Concept de procédé en <i>one-pot/two-steps</i> pour la synthèse d'amide gras de l'AMFC à partir de butanol et de pentanol. ....	107
Figure 64 : Matériau mutli-catalytique hybride (MMCH) conçu par croissance de nanoparticules de platine au sein de la cavité formée par le dodécamère de l'aminopeptidase de <i>Streptococcus pneumonia</i> . Ce MMCH a été appliqué à la conversion en tandem séquentiel de l'acide <i>p</i> -nitroanilideglutamique en <i>p</i> -phénylènediamine. ....	109
Figure 65 : Diversité de fonctionnalisation et d'incorporation des MOF pour l'élaboration de matériaux aux propriétés multiples, y compris catalytiques.....	111
Figure 66 : Frise chronologique retraçant les faits marquants en catalyse à base de MOF. ....	113
Figure 67 : Synthèse d'acétate de ( <i>S</i> )-1-(4-méthoxyphényl)-2-nitroéthyle à partir de 4-méthoxybenzaldéhyde, de nitrométhane et d'acétate de vinyle à l'aide d'un MMCH à base de MOF ZIF-67 (Co <sup>2+</sup> ), de la CalA et de nanocristaux de Pd. ....	115
Figure 68 : Dimensions (en Å) de la <i>minimal bounding box</i> calculée pour la Cv-TA à partir du fichier PDB ( <i>protein data bank</i> ) 4ba4 avec l'aide du logiciel pyMOL et du script Draw_Protein_Dimensions.py. ....	116
Figure 69 : Représentation de la structure de l'UiO-66. 1) La structure cubique face-centrée de l'UiO-66 composée du nœud métallique (turquoise) et du ligand (gris) avec une représentation atomique du cluster polyoxo-métallique et des 12 ligands d'acide téréphtalique connectées. 2) Le nœud et la structure du ligand composant la cage de 12 Å de l'UiO-66. (C) Le nœud et la structure du ligand composant la cage de 7,5 Å. ....	116
Figure 70 : Procédé catalytique hybride en <i>one-pot/one-step</i> pour la synthèse de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) à partir du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) combinant successivement une transaminase et des nanoparticules d'or immobilisées séparément sur un MOF de type UiO-66-NH <sub>2</sub> . ....	117
Figure 71 : Concentrations en HMF, HMFA, AMFA, et AMFC mesurées tout au long de la réaction hybride en <i>one-pot/one-step</i> combinant la Bm-TA/EziG <sup>TM</sup> OPAL et l'Au <sub>PVA</sub> /UiO-66-NH <sub>2</sub> . ....	118
Figure 72 : Procédé catalytique pour la conversion directe du HMF en AMFC à l'aide d'un matériau multi-catalytique hybride de type TA/Au <sub>PVA</sub> @UiO-66-NH <sub>2</sub> . ....	119
Figure 73 : Photo du robot Catimpreg de la plateforme REALCAT, sur laquelle figure la Dr. Svetlana Heyte (UCCS), ingénieure de recherche en charge de la partie chimie de la plateforme REALCAT.....	120

Figure 74 : Poudres obtenues pour les triplicas des synthèses de l'UiO-66-NH <sub>2</sub> et de l'UiO-66, avec aucun modulateur (A1-A3 et B1-B3 respectivement), de l'acide formique (C1-C3 et D1-D3 respectivement), de l'acide acétique (A4-A6 et B4-B6 respectivement), et de l'acide chloridrique (C4-C6 et D4-D6 respectivement) .....	120
Figure 75 : Diffratogrammes obtenus pour les 3 réplicas de la synthèse de l'UiO-66 en présence d'acide formique utilisé comme modulateur à l'aide du robot Catimpreg de la plateforme REALCAT. ....	121
Figure 76 : Photo du robot Autoplant de la plateforme REALCAT, sur laquelle figure la Dr. Svetlana Heyte (UCCS), ingénieure de recherche en charge de la partie chimie de la plateforme REALCAT. ....	122
Figure 77 : Image prise au microscope électronique à balayage de l'UiO-66 synthétisé à l'aide du robot Catimpreg en présence d'acide formique comme modulateur.....	123
Figure 78 : Images prise au microscope électronique à balayage de l'UiO-66 sous forme hcp obtenue à partir d'une synthèse dans l'eau, avec un rapport acide formique/solvant = 0,2, à 120 °C (gauche) et 170 °C (droite).....	124
Figure 79 : Dendrogramme (à gauche) obtenu pour la banque de transaminases TAM(A) à partir d'un alignement de séquences multiple (MSA), détaillant les clusters d'enzymes considérés. Niveau d'homologie entre les séquences (à droite), indiqué par une coloration plus importante, calculé lors de l'alignement des séquences de TAM(A) deux à deux (abscisse et ordonnée) (partie inférieure de l'image tronquée après la Classe III). ....	130
Figure 80 : Schéma de la structure d'AlphaFold2 permettant la prédiction de la structure d'une protéine à partir de sa séquence, en combinant un module composés de blocs d' <i>evoformers</i> chargé de produire une représentation des interactions entre les aminoacides d'un alignement de séquences multiple et de la matrice de contact des résidus de la séquence protéique soumise, avec un module chargé de réaliser la prédiction des angles de torsion entre les acides aminés de la chaîne peptidique. ....	131
Figure 81 : Réaction visée par Ma <i>et coll.</i> lors de leur recherche de nouvelles imine réductases (IREd) par exploration génomique et ingénierie enzymatique. ....	134
Figure 82 : Concept pour l'exploration génomique basé sur le développement d'algorithmes de <i>machine learning</i> , entraînés sur des données de criblage à haut débit, conduisant à l'élaboration d'un système d'apprentissage par renforcement. ....	137
Figure 83 : Exemple de représentation SMILES de la ciprofloxacine, permettant de convertir la structure de la molécule en une chaîne de caractère conservant l'agencement des atomes et le type de liaisons entre eux.....	138
Figure 84 : Première architecture développée pour la prédiction de l'activité (régression ou classification) des transaminases de TAM(A), reposant sur un premier jeu de 3 modules, pour l'encodage de la protéine, du donneur, et de l'accepteur, basés sur des CNN 1D ou des LSTM, couplé avec un réseau dense interconnecté. ....	139
Figure 85 : Matrices de corrélation obtenues pour la répartition prédictive en 2 (à gauche) ou 4 (à droite) classes du <i>testing set</i> , avec une architecture combinant des modules CNN-1D pour l'encodage des substrats avec un module LSTM pour celui des séquences protéiques, couplés à un réseau dense. ....	140
Figure 86 : Graphique représentant la différence entre les valeurs prédites et les valeurs réelles d'activité, obtenue avec une architecture combinant des modules CNN-1D pour l'encodage des substrats avec un module LSTM pour celui des séquences protéiques, couplés à un réseau dense. ....	140
Figure 87 : Seconde architecture développée pour la prédiction de l'activité (régression ou classification) des transaminases de TAM(A), reposant sur un premier jeu de 3 modules, pour l'encodage de la protéine, de l'accepteur et de la structure 3D du complexe enzyme-substrat, basés sur des CNN 1D, LSTM et GNN, couplé avec un réseau dense interconnecté. ....	141
Figure 88 : Poche protéique ayant obtenu le plus haut score de fixation d'un ligand à l'aide de l'outil P2Rank pour la transaminase A0AK37 (acc. num. UniProt) de la banque TAM(A). L'image de gauche montre la structure globale au format cartoon, avec la poche prédite représentée en surface gaussienne. L'image de droite montre l'intérieur du site actif prédit, et la flèche rose point vers la lysine présente à l'intérieur de la poche.....	142
Figure 89 : Comparaison entre l'emplacement prédit pour le PLP (violet) et la localisation réelle du PLP (orange) dans le site actif d'une transaminase dont la structure 3D était présente dans la PDB.....	143
Figure 90 : Visualisation, avec deux angles différents (images droite et gauche) de la structure résultant du <i>docking</i> successif de la PMP et de l'acide $\alpha$ -cétoglutarique dans la transaminase Q5N2G0 (acc. num. UniProt). ....	143
Figure 91 : Comparaisons entre les résidus de l'enzyme après <i>docking</i> des deux ligands (rose et violet, pour les deux sous-unités) et avant <i>docking</i> (orange et vert, pour les deux sous-unités), en ayant gardé flexibles les chaînes latérales de la THR 241 de la première sous-unité, et la LYS 193 (catalytique), la PHE 89 et l'ARG 92 de la seconde sous-unité. ....	144
Figure 92 : Visualisation, avec deux angles différents (images droite et gauche) de la structure résultant du <i>docking</i> de l'intermédiaire cétimine formé par la condensation de la PMP et de l'acide $\alpha$ -cétoglutarique, dans la transaminase Q5N2G0 (acc. num. UniProt). ....	145

Figure 93 : Comparaisons entre les résidus de l'enzyme après <i>docking</i> des deux ligands séparés (rose et violet, pour les deux sous-unités) et après <i>docking</i> de la cétimine (jaune), en ayant gardé flexibles les chaînes latérales de la THR 241 de la première sous-unité, et la LYS 193 (catalytique), la PHE 89 et l'ARG 92 de la seconde sous-unité.	145
Figure 94 : Comparaison de l'orientation de la PMP et du KG (verts) par rapport à celle de l'intermédiaire cétimine (gris) obtenues lors des deux <i>docking</i> réalisés sur la transaminase Q5N2G0 (acc. num. UniProt).	146
Figure 95 : (a) Schéma d'agrégation des messages pour le <i>spherical message passing</i> proposé par Liu <i>et coll.</i> (b) Illustration du calcul des angles de torsion dans l'architecture du <i>message passing</i> .	147
Figure 96 : Stratégie de synthèse de la ( <i>R</i> ) ou ( <i>S</i> )-lévoglucosénamine et lévoglucoséanamine par combinaison d'une déshydratation chimique, une réduction chimique ou enzymatique et une amination enzymatique à partir du lévoglucosane.	150
Figure 97 : Concept de procédé hybride pour la régénération du donneur d'amine nécessaire à la réaction de transamination à l'aide d'ammoniac comme source d'azote.	151
Figure 98 : Structures et dimensions de plusieurs « <i>metal-organic frameworks</i> » ayant été décrits pour l'immobilisation d'enzymes.	152
Figure 99 : Dernière étape avant déprotection de la synthèse du ligand du NU-1007, réalisée par couplage de Suzuki avec un catalyseur au Pd, sur le tetrabromopyrène et le 4-((4-(4,4,5,5-tetraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phényl)éthynyl)benzoate d'éthyle.	153
Figure 100 : Concept de matériau multi-catalytique hybride (MMCH) basé sur la co-immobilisation d'une transaminase (TA, vert) et de nanoparticules métalliques (NPM, rouge) au sein des canaux d'un <i>metal-organic framework</i> de la famille des NU-100x. Celui-ci sera ensuite utilisé pour la conversion d'alcools issus de la biomasse en amines correspondantes.	154
Figure 101 : Résumé des principales méthodes de caractérisation utilisées pour l'analyse et la compréhension des interactions entre les éléments composant un MMCH à base de MOF.	157
Figure 102 : Schéma simplifié de l'approche combinant des stratégies de criblage haut débit et l'utilisation d'algorithmes de machine learning pour la conception de nouveaux MMCH à base de MOF.	158
Figure 103 : Stratégie détaillée combinant des approches à haut débit et des algorithmes de <i>machine learning</i> pour la synthèse prédictive de matériaux biocatalytiques à base de MOF.	159

## Table des tableaux

Tableau 1 : Liste donneurs d'amine synthétisés par chimie organique durant ma thèse. ....	33
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différents types de procédés multi-catalytiques.....	85
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents types de réactions multi-catalytiques impliqués dans des procédés en « <i>one-pot/one-step</i> ». ....	86
Tableau 4 : Liste non exhaustive mais représentative d'avantages et inconvénients d'une sélection de catalyseurs chimiques supportés. ....	90

## Liste des abréviations

1D	une dimension
1P1S	<i>one-pot/one-step</i>
1P2S	<i>one-pot/two-steps</i>
2P1S	<i>two-pots/one-step</i>
2P2S	<i>two-pots/two-steps</i>
3D	trois dimensions
AAPG	appel à projet générique
ABTS	acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ACIA IAA	Association des Chimistes Ingénieurs et Cadres des Industries Agricoles et Alimentaires
ACL	acétylCoA ligases
ACN	acétonitrile
ACS	acide cystéine sulfonique
ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
AFCA	acide 5-aldéhyde-2-furancarboxylique
AlaDH	alanine déshydrogénase
AMFA	5-aminométhyl-2-furancarboxaldéhyde
AMFC	acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique
ANR	Agence Nationale de la Recherche
APTMS	3-aminopropyltriméthoxysilane
ARN	acide ribonucléique
AspTA	aspartate transaminase
ATG	analyse thermogravimétrique
BBI	Bio-Based Industries
BCAT	<i>branched-chain aminotransferase</i>
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BLOSUM	<i>BLOcks SUBstitution Matrix</i>
BPI	Banque Publique d'Investissement
BTB	<i>bromotimol blue</i>
CASP	Critical Assessment of Structure Prediction
CBS	<i>chromogenic biomass substrates</i>
CBSO	Club de Biocatalyse en Synthèse Organique
CEA	Commissariat à l'Énergie Atomique
CERAPS	Centre d'Études et de Recherches Administratives, Politiques et Sociales
CLEAs	<i>cross-linked enzyme aggregates</i>
CNN	<i>convolutionnal neural network</i>
COC	acide 2-(carboxycarbonyl)-4-oxoazetidine-3-carboxylique
COF	<i>covalent-organic frameworks</i>
CoSO	Comité pour la Science Ouverte
CPC	cetylpyridinium chloride
CPER	contrat de plan Etat-Région
CWDE	<i>cell wall degrading enzymes</i>
D-AlaTA	D-alanine transaminase
DC	déracémisation cyclique
DFT	<i>density functionnal theory</i>
DHLc	<i>11<math>\beta</math>,13-dihydrolactucine</i>
DHLp	<i>11<math>\beta</math>,13-dihydrolactucopicrine</i>
DHNV	2,5-dihydroxynorvaline
DKR	<i>dynamic kinetic resolution</i>
DMF	diméthyleformamide
DMOP	acide 3,3-diméthyl-2-oxopentanedioïque
DMS	<i>deep mutational scanning</i>



DTNB	acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)
EGID	<i>European Genomic Institute for Diabetes</i>
ETD	équivalent en travaux dirigés
FAIR data	Faciles à trouver, Accessibles, Interopérables et Réutilisables
FARE	Fonds d'Aide à la Recherche et à l'Évaluation en hépato-gastroentérologie
FDCA	acide 2,5-furandicarboxylique
FDMA	furan-2,5-diyl diméthanamine
FDSR	<i>FAIR Data and Software supporting Reproducible Research</i>
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
GAH	glutaraldéhyde
GCN	<i>graph convolutional network</i>
GI	glucose isomérase
Glyox	glyoxylate
GMM	<i>gut microbiota medium</i>
GNN	<i>graph neural network</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	dioxyde de dihydrogène
HAL	Hyper Article en Ligne
Hal	homoalanine
hcp	<i>hexagonal close packing</i>
HDL	hydroxydes doubles lamellaires
HEI	Hautes Etudes Industrielles
Hfe	homophénylalanine
Hglu	4-hydroxyglutamate
HisPTA	histidinol-phosphate
HMF	5-hydroxyméthylfurfural
HMFA	5-hydroxyméthyl-2-aminométhylfurane
HMOP	acide 3-hydroxy-4-méthyl-2-oxopentanoïque
HOBA	acide 3-hydroxy-2-oxobutanoïque
HOP	acide 4-hydroxy-2-oxopentanoïque
HOPB	acide 4-hydroxy-2-oxo-4-phénylbutanoïque
HOPP	acide 3-hydroxy-2-oxo-3-phénylpropanoïque
HPA	$\beta$ -hydroxypyruvate
HPLC-MS	chromatographie en phase liquide à haut pression assistée par spectrométrie de masse
HPPO	1-hydroxy-3-phénylpropan-2-one
HPT	hypotaurine
HTCD	High-Throughput Catalyst Design
HTS	<i>high-throughput screening</i>
ICB	<i>insoluble chromogenic biomass</i>
ICCF	Institut de Chimie de Clermont-Ferrand
IEMN	Institut d'Électronique de Microélectronique et de Nanotechnologie
ILV	Institut Lavoisier de Versailles
INFINITE	<i>Institute for Translational Research in Inflammation</i>
IPL	Institut Pasteur de Lille
ITS	espaceurs internes transcrits
JCC	Journées de Chimie de Coordination
KG	$\alpha$ -cétoglutarate
L-AAO	L-aminoacide oxydase
LAE	Laboratoire Agronomie et Environnement
LB	Luria-Bertini
Lc	lactucine
IDDT	<i>local-distance difference test</i>
LDH	lactate déshydrogénase
LOD	<i>limit of detection</i>
Lp	lactucopicrine

LRGP	Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
LST	lactones sesquiterpéniques
LSTM	long-short term memory
M2SV	Médicaments et Molécules pour agir sur les Systèmes Vivants
MABC	<i>Machine Learning and AI in Bio(Chemical) Engineering Conference</i>
MALDI-Tof	<i>matrix assisted laser desorption ionization - time of flight</i>
MBTH	3-méthyl-2-benzothiazolinonehydrazone
MCBL	microscopie confocale à balayage laser
MEB	microscopie électronique à balayage
MER	<i>minor enantiomer recycling</i>
MHPT	méthylhypotaurine
ML	<i>machine learning</i>
MM-MOF	mixedmetal-MOF
MMC	matériaux multi-catalytiques
MMCH	matériaux multi-catalytiques hybrides
MOF	<i>metal-organic framework</i>
MSA	<i>multiple sequence alignment</i>
MSCA DN	Marie Skłodowska-Curie Actions Doctoral Network
MTBE	methyl tert-butyl ether
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	dihydro nicotinamide adénine dinucléotide
NB	<i>nutrient broth</i>
NHC	N-heterocyclic carbenes
NPM	nanoparticules métalliques
OPBA	acide 2-oxo-4-phénylbutanoïque
PAM	<i>point accepted mutation</i>
PCP	<i>porous coordination polymer</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEARL	<i>Programme for EARly-stage Researchers in Lille</i>
PEF	polyéthylène 2,5-furandicarboxylate
PGL	<i><math>\beta</math>-D-glucopyranoside de périllyle</i>
PHC	Partenariat Hubert Curien
PLP	phosphate de pyridoxal
PMP	pyridoxamine
PO	phénol oxydases
POH	alcool périllyque
PRC	Projet de Recherche Collaboratif
PRCI	Projets de Recherche Collaboratifs Internationaux
PSerTA	phosphosérine transaminase
PVP	polyvinylpyrrolidone
Pyr	pyruvate
PyrAL	pyruvate aldolases
QPAH	Qualité des Procédés Agroalimentaires et Halieutiques
RaMe $\beta$ CD	<i>randomly methylated <math>\beta</math>-cyclodextrin</i>
RESPDOR	<i>rotational-echo saturation-pulse double-resonance</i>
RMN	résonance magnétique nucléaire
RMSE	<i>root-mean-square error</i>
RNN	<i>recurrent neural network</i>
SATT	Société d'Accélération du Transfert de Technologies
SAV	sciences analytiques du vivant
SFAM	<i>simultaneous frequency and amplitude modulation</i>
siRNA	ARN interférents
SMILES	<i>simplified molecular-input line-entry system</i>

SNFGE	Société Nationale Française de Gastro-Entérologie
SO <sub>2</sub>	dioxyde de soufre
ssNMR	résonnance magnétique nucléaire du solide
SVM	support vecteur-machine
TA	transaminase
TEM	<i>transmission electron microscopy</i>
Tle	<i>tert</i> -leucine
TPP	thiamine pyrophosphate
UCCS	Unité de Catalyse et Chimie du Solide
ULNE	Université Lille Nord-Europe
UMR	Unité Mixte de Recherche
URD ABI	Unité de Recherche et de Développement Agro-Biotechnologies Industrielles
VBA	<i>visual basic for applications</i>
$\beta$ AS	$\beta$ -aminosulfonique

## Avant-propos

Il semble qu'il arrive un moment où il devient important de se poser et de faire un bilan de ce que l'on a ou non accompli, si l'on veut pouvoir devenir un chercheur innovant, un encadrant pédagogue et un scientifique consciencieux. Ce moment est arrivé pour moi, et j'aimerais partager ces concepts et projets scientifiques qui ont rythmés ma vie durant ces 7 dernières années, depuis la fin de mon doctorat, et qui ont fait de moi le chercheur que je suis aujourd'hui.

Aussi, ce mémoire, après un préambule dédié à mon *curriculum vitae* et aux indicateurs associés, tentera à travers une première partie, de faire la synthèse des travaux de recherche que j'ai effectués depuis ma thèse jusqu'au développement de ma thématique de recherche actuelle. Il se poursuivra ensuite avec un second volet au sein duquel je détaillerai les concepts que j'aimerais développer et mettre en application dans les prochaines années de ma carrière.

Compte-tenu de l'éclectisme de mon parcours, j'ai choisi de découper mes travaux en 4 axes de recherche, chacun illustrant une thématique distincte qui servira de socle pour mon projet futur :

- La recherche de nouvelles enzymes par exploration de la biodiversité, et leur application pour la synthèse de nouveaux composés pour la chimie ;
- Le développement de nouvelles stratégies de criblage à haut débit pour la valorisation de la biomasse et l'exploitation de souches microbiennes ;
- L'exploration du concept de catalyse hybride, combinant catalyseurs chimiques et biologiques, pour le développement de nouvelles voies de valorisation de molécules issues de la biomasse ;
- La conception d'outils informatiques et d'algorithmes en *machine learning* pour la prédiction de l'activité d'enzymes.

Chaque étude détaillée au sein de ces 4 axes sera accompagnée en premier lieu d'une courte partie bibliographique devant permettre de la replacer dans son contexte scientifique et industriel, en particulier lorsque celle-ci possède un but applicatif clairement affiché. Une partie bibliographique un peu plus conséquente sera proposée pour l'axe concernant la catalyse hybride, afin de permettre au lecteur d'appréhender les concepts sous-jacents à cette jeune thématique de recherche, ainsi que la terminologie associée. Enfin, compte-tenu de l'aspect hautement collaboratif et interdisciplinaire de ces travaux, j'inclurai à la fin de chaque sous-partie un résumé de ma contribution pour mieux permettre au lecteur d'évaluer mon implication. A la fin de chaque axe je détaillerai également en quoi celui-ci s'articule avec mon futur projet de recherche.

Je détaillerai ensuite celui-ci dans la seconde partie de ce manuscrit. Il visera la conception de nouveaux matériaux multi-catalytiques hybrides, combinant des enzymes et des nanoparticules métalliques, pour la réalisation de nouvelles voies de synthèses sous la forme de cascade intégrées, appliquées à la transformation de molécules issues de la biomasse. Cette approche sera assistée par différentes approches méthodologies et la création de nouveaux outils, en particulier basés sur l'expérimentation à haut débit et sur la programmation en d'algorithmes en *deep learning* entraînés sur des données de criblage. Je terminerai cette partie en présentant mes actions en science participative et en science ouverte car elles sont pour moi, l'un des principaux moteurs de ma recherche.

# Curriculum vitae

## Cursus et postes

2021 – aujourd'hui : Chargé de recherche contractuel (CDI de mission), Équipe VAALBIO, Unité de Catalyse et Chimie du Solide, Centrale Lille ;

2016 – 2021 : Ingénieur de recherche contractuel, Plateforme REALCAT, UMR Transfrontalière BioEcoAgro, Université de Lille ;

2012 – 2015 : Doctorat en chimie biologique, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Clermont-Ferrand II Blaise Pascal ;

2011 – 2012 : Master 2 en chimie organique, bio-organique et environnementale, Université Clermont-Ferrand II Blaise Pascal ;

2009 – 2012 : Élève ingénieur en Biotechnologies, Département Génie Biologique, Polytech' Clermont-Ferrand.

## Production scientifique

### Synthèse

Nombre de publications avec comité de lecture	24 (76 % en libre accès) <sup>1</sup>
Nombre de publication en <i>pre-print</i>	1
Nombre de publications autres (proceedings, actes de colloques, chapitre d'ouvrage, ...)	8
Nombre de brevets et dépôts d'invention	1
Nombre de communications orales	12
Nombre de communications par poster	10
Nombre de séminaires invités	8

### Articles publiés dans des journaux à comité de lecture

1. High-Throughput Quantitative Screening of Glucose-Stimulated Insulin Secretion and Insulin Content Using Automated MALDI-TOF Mass Spectrometry. Delannoy C.; **Heuson, E.**; Herledan, A.; Oger, F.; Thiroux, B.; Chevalier, M.; Gromada, X.; Rolland, L.; Froguel, P.; Deprez, B.; Paul, S.; Annicotte, J.-S.\* *Cells*, 2023, 12 (6), 849. DOI : 10.3390/cells12060849 ;
2. Strengthening the Connection between Science, Society and Environment to Develop Future French and European Bioeconomies: Cutting-Edge Research of VAALBIO Team at UCCS. Araque-Marin, M.; Bellot Noronha, F.; Capron, M.; Dumeignil, F.; Friend, M.; **Heuson, E.**; Itabaiana, I.; Jalowiecki-Duhamel, L.; Katryniok, B.\*; Löfberg, A.; Paul, S.\*; Wojcieszak, R. *Molecules*, 2022, 27 (12), 3889. DOI : 10.3390/molecules27123889 ;

---

<sup>1</sup> D'après l'archive ouverte HAL (consultée le 01/08/2023)

3. Screening of Antimicrobial Activities and Lipopeptide Production of Endophytic Bacteria Isolated from Vetiver Roots. Munakata, Y.; **Heuson, E.**; Daboudet, T.; Deracinois, B.; Duban, M.; Hehn, A.; Coutte, F.; Slezack-Deschaumes, S.\* *Microorganisms*, 2022, 10 (2), 209. DOI : 10.3390/microorganisms10020209 ;
4. Pt Nanoparticles with Enhanced Deaminase-like Activity: Example of Oxidative Deamination of 5-Hydroxymethylfurfurylamine and Glutamic Acid. Lancien, A.; **Heuson, E.**; Dumeignil, F.; Itabaiana Jr, I.; Froidevaux, F.; Wojcieszak, R.\* *ChemNanoMat*, 2022, 8 (5), e202200062. DOI : 10.1002/cnma.202200062 ;
5. Combining analytical approaches for better lignocellulosic biomass degradation: a way of improving fungal enzymatic cocktails? Raulo, R.; **Heuson E.**; Froidevaux F.; Phalip V.\* *Biotechnology Letters*. 2021, 43, 2283–2298. DOI : 10.1007/s10529-021-03201-2 ;
6. Optimisation of catalysts coupling in multi-catalytic hybrid materials: perspectives for the next revolution in catalysis. **Heuson, E.\***; Froidevaux, R.; Itabaiana Jr., I.; Wojcieszak, R.; Capron, M.; Dumeignil, F. *Green Chemistry*. 2021, 23, 1942-1954. DOI : 10.1039/D0GC04172F ;
7. Biocatalysed Synthesis of Chiral Amines: Continuous Colorimetric Assays for Mining Amine- Transaminases. Gourbeyre, L.; **Heuson, E.**; Charmantray, F.; Hélaïne, V.; Debard, A.; Petit, J.-L.; De Berardinis, V.; Gefflaut, T.\* *Catalysis Science & Technology*. 2020, 11, 904-911. DOI : 10.1039/D0CY02070B ;
8. Hybrid conversion of 5-hydroxymethylfurfural to 5-aminomethyl-2-furancarboxylic acid: toward new bio-sourced polymers. Lancien, A.; Wojcieszak, R.; Cuvelier, E.; Duban, M.; Dhulster, P.; Paul, S.; Dumeignil, F.; Froidevaux, R.; **Heuson, E.\***. *ChemCatChem*. 2020, 13, 247–259. DOI : 10.1002/cctc.202001446 ;
9. Plasmon-Driven Electrochemical Methanol Oxidation on Gold Nanohole Electrodes. Pang, L.; Barras, A.; Mishyn, V.; Heyte, S.; **Heuson, E.**; Oubaha, H.; Sandu, G.; Melinte, S.; Boukherroub, R.\*; Szunerits, S.\* *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2020, 12 (45), 50426. DOI : 10.1021/acsami.0c14436 ;
10. The various levels of integration of chemo- and bio-catalysis towards hybrid catalysis. **Heuson, E.\*** & Dumeignil, F. *Catalysis Science & Technology*. 2020, 10 (21), 7082. DOI : 10.1039/D0CY00696C ;
11. Enantioselective Innovative microscale workflow from fungi cultures to Cell Wall-Degrading Enzyme screening. Raulo, R.; **Heuson, E.**; Siah, A.; Phalip, V.; Froidevaux, R.\* *Microbial Biotechnology*. 2019, 12 (6), 1286. DOI : 10.1111/1751-7915.13405 ;
12. Enantioselective Synthesis of d- and l- $\alpha$ -Amino Acids by Enzymatic Transamination Using Glutamine as Smart Amine Donor. **Heuson, E.**; Charmantray, F.; Petit, J.-L.; de Berardinis, V.; Gefflaut, T.\* *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2019, 361 (4), 778. DOI : 10.1002/adsc.201801278 ;
13. Lipase catalyzed esterification of formic acid in solvent and solvent-free systems. Aljawish, A.\*; **Heuson, E.**; Bigan, M.; Froidevaux, R.\* *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019, 20, 101221. DOI : 10.1016/j.bcab.2019.101221 ;
14. Screening of Lipopeptide-Producing Strains of *Bacillus sp.* Using a New Automated and Sensitive Fluorescence Detection Method. **Heuson, E.**; Etchegaray, A.; Filipe, S. L.; Beretta, D.; Chevalier, M.; Phalip, V.; Coutte, F.\* *Biotechnology Journal*. 2019, 14 (4), 1800314. DOI : 10.1002/biot.201800314 ;
15. Design of a multi-well plate for high-throughput characterization of heterogeneous catalysts by XRD, FT-IR, Raman and XRF spectroscopies. Thuriot-Roukos, J.\*; Bennis, M.; **Heuson, E.**; Roussel, P.; Dumeignil, F.; Paul, S. *RSC Advances*. 2018, 8 (71), 40912. DOI : 10.1039/C8RA08216B ;
16. From a Sequential Chemo-Enzymatic Approach to a Continuous Process for HMF Production from Glucose. Gimbernat, A.; Guehl, M.; Lopes Ferreira, N.; **Heuson, E.**; Dhulster, P.; Capron, M.; Dumeignil, F.; Delcroix, D.; Girardon, J.-S.; Froidevaux, R.\* *Catalysts*. 2018, 8, 335. DOI : 10.3390/catal8080335 ;
17. Novel approach to identify phenoloxidases inhibitors: Optimization of spectrophotometric MBTH assay for high throughput use enzymatic assays and analysis. Zeyer, E.; **Heuson, E.**; Himber, C.; Phalip, V.; Le Bris, C.; Dhulster, P.; Brisabois, A.; Flahaut, C.; Cudennec, B.; Grard, T.; Duflos, G.\* *Food Control*. 2018, 93, 83-91. DOI : 10.1016/j.foodcont.2018.05.043 ;

18. Stereoselective Synthesis of  $\gamma$ -Hydroxy- $\alpha$ -Amino Acids through Aldolase–transaminase Recycling Cascades. Guérard-Hélaine, C.; **Heuson, E.**; Ndiaye, M.; Gourbeyre, L.; Lemaire, M.; Hélaine, V.; Charmantray, F.; Petit, J.-L.; Salanoubat, M.; Berardinis, V. de; Gefflaut, T.\* *Chemical Communication*. 2017, 53 (39), 5465– 5468. DOI : 10.1039/C7CC00742F ;
19. High-throughput strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Jacques, P.; Béchet, M.; Bigan, M.; Caly, D.; Chataigné, G.; Coutte, F.; Flahaut, C.; **Heuson, E.**; Leclère, V.; Lecouturier, D.; Phalip, V.; Ravallec, R.; Dhulster, P.; Froidevaux, R.\* 2017, 40 (2), 161–180. DOI : 10.1007/s00449-016-1690-x ;
20. Interactions between *Kluyveromyces Marxianus* from Cheese Origin and the Intestinal Symbiont Bacteroides Thetaiotaomicron: Impressive Antioxidative Effects. Ceugniz, A.; Tourret, M.; Dussert, E.; Coucheney, F.; Deracinois, B.; Jacques, P.; Flahaut, C.; **Heuson, E.**; Drider, D.; Behra-Miellet, J.\* *Journal of Food Science and Technology*. 2017, 81, 281–290. DOI : 10.1016/j.lwt.2017.03.056 ;
21. One-Pot, Two-Step Cascade Synthesis of Naturally Rare L- Erythro (3S,4S) Ketoses by Coupling a Thermostable Transaminase and Transketolase. Lorillière, M.; Sousa, M. D.; Bruna, F.; **Heuson, E.**; Gefflaut, T.; Berardinis, V. de; Saravanan, T.; Yi, D.; Fessner, W.-D.; Charmantray, F.; Hecquet, L.\* *Green Chemistry*. 2017, 19 (2), 425–435. DOI : 10.1039/C6GC02015A ;
22. Continuous Colorimetric Screening Assays for the Detection of Specific L- or D- $\alpha$ -Amino Acid Transaminases in Enzyme Libraries. **Heuson, E.**; Petit, J.-L.; Debar, A.; Job, A.; Charmantray, F.; de Berardinis, V.\*; Gefflaut, T.\* *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100 (1), 397–408. DOI : 10.1007/s00253-015- 6988-0 ;
23. Profiling Substrate Specificity of Two Series of Phenethylamine Analogs at Monoamine Oxidase A and B. **Heuson, E.**; Storgaard, M.; Huynh, T. H. V.; Charmantray, F.; Gefflaut, T.; Bunch, L.\* *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2014, 12 (43), 8689–8695. DOI : 10.1039/C4OB01377H ;
24. PDBe: Protein Data Bank in Europe. Velankar, S.; Alhroub, Y.; Best, C.; Caboche, S.; Conroy, M. J.; Dana, J. M.; Fernandez Montecelo, M. A.; van Ginkel, G.; Golovin, A.; Gore, S. P.; Gutmanas, A.; Haslam, P.; Hendrickx, P. M. S.; **Heuson, E.**; Hirshberg, M.; John, M.; Lagerstedt, I.; Mir, S.; Newman, L. E.; Oldfield, T. J.; Patwardhan, A.; Rinaldi, L.; Sahni, G.; Sanz-García, E.; Sen, S.; Slowley, R.; Suarez-Uruena, A.; Swaminathan, G. J.; M. F. Symmons, Vranken, W. F.; Wainwright, M.; Kleywegt, G. J.\* *Nucleic Acids Research*. 2012, 40 (Database issue), D445-452. DOI : 10.1093/nar/gkr998.

### ***Publications en pre-print***

1. Biocatalytic approach to the chemoselective acylation of sesquiterpene lactones from chicory: a pathway to novel ester derivatives. Mosheim J. R.; Ruggieri, F.; Humeau, C.; Hance, P.; Willand, N.; Hilbert, J.-L.; **Heuson, E.\***; Froidevaux, R.\* *ChemRxiv*, 2023. DOI : 10.26434/chemrxiv-2023-3c05k-v2 .

### ***Autres publications (proceedings, actes de colloques, chapitres d'ouvrages,...)***

1. Nouvelles approches à haut-débit pour l'optimisation de cocktails enzymatiques fongiques pour une valorisation plus efficace de la biomasse lignocellulosique. **Heuson, E.\***; Raulo, R.; Froidevaux, R.; Phalip, V. *Revue Industries Agro-Alimentaires*, 2022, 14-19 ;
2. Biocatalyse et catalyse : quelles synergies pour la synthèse chimique ? **Heuson E.\*** *L'Actualité Chimique*. 2021, 467, 35-37 ;
3. 15 - Hybrid catalysis: bridging two worlds for greener chemicals and energy production. **Heuson, E.\*** and Dibenedetto, A. in *Biorefinery: From Biomass to Chemicals and Fuels*; De Gruyter, 2021. DOI : 10.1515/9783110705386-016 ;
4. La catalyse, la diversité au service de l'efficacité **Heuson, E.\***; Froidevaux, R.; Itabaiana Jr, I.; Wojcieszak, R.; Capron, M.; Dumeignil, F.\* *L'Actualité Chimique*. 2020, 454, 7-10 ;
5. Des réactions multi-catalytiques au concept de catalyse hybride. **Heuson, E.\***; Froidevaux, R.; Itabaiana Jr, I.; Wojcieszak, R.; Capron, M.; Dumeignil, F.\* *L'Actualité Chimique*. 2020, 454, 11-17 ;

6. Cinquante nuances de catalyse hybride. Heuson, E.\*; Froidevaux, R.; Girardon, J.-S.; Itabaiana Jr, I.; Wojcieszak, R.; Capron, M.; Dumeignil, F.\* *L'Actualité Chimique*. 2020, 454, 18-26 ;
7. L'avènement des matériaux multi-catalytiques hybrides, vers une combinaison optimale des catalyseurs. Heuson, E.\*; Froidevaux, R.; Itabaiana Jr, I.; Wojcieszak, R.; Capron, M.; Paul, S.; Dumeignil, F.\* *L'Actualité Chimique*. 2020, 454, 27-36 ;
8. Continuous High-Throughput Colorimetric Assays for  $\alpha$ -Transaminases. Heuson, E.; Petit, J.-L.; Charmantray, F.; Bérardinis, V. de; Gefflaut, T. In *Protein Engineering; Methods in Molecular Biology*; Humana Press, New York, NY, 2018; pp 233–245. DOI : 10.1007/978-1-4939-7366-8\_13.

### ***Brevets et déclarations d'inventions***

1. Déclaration d'invention dans le cadre du projet Ins-Spect sur la nouvelle stratégie de criblage automatisée de la sécrétion d'hormones humaines, pour le diagnostic et la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques – Université de Lille (2019) ;
2. Participation au projet scientifique ayant mené au dépôt du brevet [FR3077221A1](#) “Réacteur en forme de h comprenant des déflecteurs” – Université de Lille (2019).

### ***Communications orales***

1. “Enzyme activity prediction using neural networks, docking and high-throughput screening results” **6th Machine Learning and AI in Bio(Chemical) Engineering Conference** (6<sup>th</sup> MABC), 06-07/07/2023, Cambridge, United Kingdom ;
2. “Hybrid catalysis: towards an optimal combination of catalysts Application to HMF valorization” **ISGC2022**, 16-20/05/2022, La Rochelle, France ;
3. “Valorisation of bio-based furfurals by hybrid catalysis: towards the synthesis of new amine polymers and surfactants.” **CBSO 2021**, 28/09-01/10/2021, Cap Ferret, France ;
4. “REALCAT: an high-throughput integrated platform dedicated to the design of biorefineries catalysts.” **EUBCE 2019**, 27-30/05/2019, Lisbon, Portugal ;
5. “High-throughput screening of bacterial and fungal enzyme cocktail for efficient biomass pre-treatment.” **PASS-BIO Science Diner**, 25/05/2019, Berlin, Germany ;
6. “REALCAT: an high-throughput integrated platform dedicated to the design of biorefineries catalysts.” **Exploring Lignocellulosic Biomass 2018**, 26-29/06/2018, Reims, France ;
7. “Innovative high-throughput microplate approach for cell wall degrading enzyme production based on fungi and lignocellulosic raw biomass interaction.” **Exploring Lignocellulosic Biomass 2018**, 26-29/06/2018, Reims, France ;
8. “Innovative high-throughput microplate approach for cell wall degrading enzyme production based on fungi and lignocellulosic raw biomass interaction.” **CBSO 2018**, 22-25/05/2018, Guidel Plage, France ;
9. “The REALCAT platform: high-throughput screening equipment dedicated to biomass valorization.” **Bioingest**, 11/09/2017, Lille, France ;
10. “A Novel General Screening Assay for Transaminases.” **Transam 2.0**, 04-06/03/2015, Greifswald, Germany ;
11. “Mise au point d'un nouveau test de criblage pour la découverte de transaminases” **CBSO**, 03-06/06/2014, Carry Le Rouet, France ;
12. “A new screening assay for transaminases” **SysBioCat Summer School**, 28/05-01/06, Certosa di Pontignano, Siena, Italy.



### ***Communications par affiche***

1. “Plug-flow reactor-based Acid Fermentation for Small-Scale BIOrefineries.” **EUBCE 2019**, 11-13/12/2019, Lisbon, Portugal ;
2. “Aldolase-Transaminase recycling cascades for  $\gamma$ -amino alcohols synthesis.” **Amine Biocat 3.0**, 11-13/12/2017, Manchester, United Kingdom ;
3. “Alternatives to sulfites for shrimp preservation: Standardized assay of 40 potential inhibitors of melanosis” **BioTrans 2017**, 09-13/07/2017, Budapest, Hungary ;
4. “Alternatives to sulfites for shrimp preservation: Standardized assay of 40 potential inhibitors of melanosis” **Bio2Actives**, 05-07/07/2017, Quimper, France ;
5. “High-throughput screening of enzymatic cocktails obtained from the interaction of *Zymoseptoria tritici* with wheat straw” **SFR Condorcet**, 08-09/06/2017, Lille, France ;
6. “Advanced high throughput bio(chemical) technologies platform for biorefineries hybrid catalysts design” **Explorons la biomasse lignocellulosique !**, 23-24/06/2016, Reims, France ;
7. “Mining for transaminases: development of new screening assays” **BioTrans 2015**, 26-30/07/2015, Vienna, Austria ;
8. “Aldolase-Transaminase loops for  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -hydroxy acids synthesis.” **Transam 2.0**, 04-06/03/2015, Greifswald, Germany ;
9. “Boucles bi-enzymatiques pour la synthèse d’ $\alpha$ -amino- $\gamma$ -hydroxy acides.” **CBSO 2014**, 03-06/06/2014, Carry Le Rouet, France ;
10. “A new screening assay for transaminases” **SysBioCat Summer School**, 28/05-01/06/2014, Certosa di Pontignano, Siena, Italy.

### ***Séminaires invités***

1. Développement de la biocatalyse et de la catalyse hybride pour de nouvelles voies de synthèses chimiques plus vertes. Vers une valorisation de la biomasse dans une démarche durable d’économie circulaire » **8<sup>ème</sup> Forum Agoriales, pour l’emploi scientifique dans les IAA**, 16/06/2022, Paris, France ;
2. “De la biocatalyse à la catalyse hybride, les enzymes au coeur de procédés sélectifs et durables” **Les mardis de la chimie durable**, 08/03/2022, on-line ;
3. “La catalyse hybride : vers une combinaison optimale des catalyseurs et procédés.” **Journée technique “biocatalyse et catalyse : quelles synergies pour la synthèse chimique?”**, 13/10/2020, on-line ;
4. “Automated robotic platforms coupled to BioLector and MALDI-Tof: from HT microorganisms selection and identification to HT fermentation for the production of enzyme cocktails aiming the valorization of lignocellulosic biomass.” **RoboWorkshop 2018**, 07-09/11/2018, Darmstadt, Germany ;
5. “Innovative high-throughput microplate approach for cell wall degrading enzyme production based on fungi and lignocellulosic raw biomass interaction.” **Beckman User Meeting**, 13-14/06/2018, Berlin, Germany ;
6. “The REALCAT platform: high-throughput screening equipment dedicated to biomass valorization.” **Bio2Actives**, 05-07/07/2017, Quimper, France ;
7. “REALCAT: A new high-throughput platform dedicated to the design of biorefineries catalysts” **Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale**, 27/02/2017, Pisa, Italy ;
8. “The REALCAT platform: high-throughput screening equipment dedicated to new enzymes discovery and process design for biomass valorization.” **Guangxi Academy of Agricultural Sciences**, 26/10-01/11/2016, Nanning, China.

## Encadrements scientifiques

### **Doctorant·e·s (9)**

**Lucas Bisel**, 3 ans, Doctorat (2023 – 2026).

“Recherche de nouvelles enzymes pour la synthèse de monomères polymérisables halogénés et aminés par biocatalyse et catalyse hybride (PLASTILOOP2.0)”

Doctorat en *Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement*, Unité de Catalyse et Chimie du Solide, Centrale Lille (Lille, France)

Codirection avec : Pr. Rénato Froidevaux

**Oumaima Rabaoui**, 3 ans, Doctorat – CIFRE (2023 – 2026).

“Optimisation des propriétés physico-chimiques de nouvelles protéines alimentaires colorées par évolution dirigée (OPALE)”

Doctorat en *Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement*, UMR Transfrontalière BioEcoAgro, Université de Lille (Lille, France)

Codirection avec : Dr. David Gagneul

**Richard Martin**, 3 ans, Doctorat (2023 – 2026).

“Développement de nouveaux catalyseurs métalliques supportés pour l'oxydation de composés aromatiques en vue de la formation de monomères fonctionnalisés (PLASTILOOP2.0)”

Doctorat en *Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement*, Unité de Catalyse et Chimie du Solide, Centrale Lille (Lille, France)

Codirection avec : Pr. Sébastien Paul.

**Abel Cousin**, 3 ans, Doctorat (2022 – 2025).

“Recherche de nouveaux microorganismes assistée par criblage haut débit et *machine learning*, pour la production de cocktails enzymatiques permettant la dégradation de polymères pétro-sourcés (PLASTILOOP2.0)”

Doctorat en *Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement*, Unité de Catalyse et Chimie du Solide, Centrale Lille (Lille, France)

Codirection avec : Pr. Sébastien Paul et Pr. Vincent Phalip

**Violette Hamers**, 3 ans, Doctorat – CIFRE (2022 – 2025).

“Découverte de nouvelles substances naturelles fongicides par criblage à haut débit de la biodiversité”

Doctorat en *Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement*, UMR Transfrontalière BioEcoAgro, Université de Lille (Lille, France)

Codirection avec : Pr. Vincent Phalip

**Juan Rodriguez Mosheim**, 3 ans, Doctorat (2020 – 2023).

“Obtention de terpènes biosourcés et fonctionnalisés par biocatalyse pour des applications en pharmacologie et en biocontrôle (EZTERP)”

Doctorat en *Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement*, UMR Transfrontalière BioEcoAgro, Université de Lille (Lille, France)

Co-encadrement avec : Pr. Rénato Froidevaux.

**Eléonore Méphane**, 3 ans, Doctorat (2019 – 2022).

“Conception de cocktails issus de co-cultures de bactéries et champignons pour de nouveaux bio-fongicides”

Doctorat en *Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement*, UMR Transfrontalière BioEcoAgro, Université de Lille (Lille, France) – Co-tutelle avec l'Unité de Recherche et de Développement Agro-Biotechnologies Industrielles (URD ABI) d'AgroParisTech

Co-encadrement avec : Pr. Vincent Phalip et Pr. Michel Lopez.

**Antoine Lancien**, 3 ans, Doctorat (2018 – 2021).

“Synthèse d'amines bio-sourcées à l'aide de procédés hybrides combinant des nanoparticules métalliques supportées et des transaminases (HybCat4Bio)”

Doctorat en *Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement*, UMR Transfrontalière BioEcoAgro, Université de Lille (Lille, France)

Co-encadrement avec : Pr. Rénato Froidevaux.

**Estelle Zeyer**, 18 mois, Doctorat (2016 – 2018).

“Inhibition de la mélanose post mortem chez la crevette *Penaeus monodon* : Étude des activités enzymatiques phénoloxydases et recherche de conservateurs alternatifs aux sulfites”

Doctorat en *Ingénierie des Fonctions Biologiques*, Université du Littoral Côte d’Opale (Boulogne, France).

### ***Chercheur·se·s Post-Doctoraux (5)***

**Wissal Ben Ali**, 24 mois (2023 – 2025).

“Recherche de nouvelles enzymes pour dégradation de polymères pétro-sourcés en monomères polymérisables (PLASTILOOP2.0)”

Co-encadrement avec : Pr. Sébastien Paul

Centrale Lille (Lille, France).

**María Martínez-Ordaz**, 18 mois (2022 – 2024).

“Développement d’une boussole institutionnelle pour l’étude du caractère durable de la production de polymères aromatiques de spécialité (PLASTILOOP2.0)”

Co-encadrement avec : Pr. Sébastien Paul et Pr. Michèle Friend

Centrale Lille (Lille, France).

**Jonathan Bassut**, 12 mois (2021 – 2022).

“Production de furfurylamines par catalyse hybride (HybCat4Bio)”

Co-encadrement avec : Pr. Rénato Froidevaux

Centrale Lille (Lille, France).

**Clément Delannoy**, 24 mois (2019 – 2021).

“Utilisation de la spectrométrie de masse pour la quantification automatisée d’hormones à partir d’échantillons biologiques complexes”

Co-encadrement avec : Pr. Jean-Sébastien Annicotte et Pr. Sébastien Paul

EGID (Lille, France).

**Roxane Raulo**, 36 mois (2017 – 2021).

“Production de cocktails d’enzymes fongiques pour la dégradation de la biomasse lignocellulosique (CockEnzStoc & PASS-BIO)”

Co-encadrement avec : Pr. Rénato Froidevaux et Pr. Vincent Phalip

Université de Lille et Centrale Lille (Lille, France).

### ***Stagiaires (19)***

**Loris Meziani**, 6 mois, Stage de Master 2.

“Synthèse de nouveaux MOF de la famille des NU-100x pour l’immobilisation de transaminase en vue de la synthèse d’amine biosourcées”

Université de Lille (Lille, France), 2023.

**Guillaume Darlot**, 1 mois, 1<sup>ère</sup> année de diplôme d’ingénieur.

“Combinaison d’algorithmes en *machine learning* pour la prédiction d’activité de transaminases à partir de la simulation de complexes 3D enzyme-substrats”

Centrale Lille (Lille, France), 2023.

**Emilien Millet**, 1 mois, 1<sup>ère</sup> année de diplôme d’ingénieur.

“Développement d’algorithmes en *machine learning* pour le *docking* de transaminases avec leurs substrats”

Centrale Lille (Lille, France), 2023.

**Oumaima Rabaoui**, 6 mois, Stage de Master 2.

“Modification par biologie moléculaire de protéines colorées en vue de leur formulation au sein d’ingrédients pour la consommation humaine”

Centrale Lille (Lille, France), 2022.

**Romain Guignon**, 6 mois, Stage de Master 2.

“Synthèse de ligands organique pour la production de MOF possédant des pores de taille importante en vue de l’incorporation d’enzyme en leur sein”

Université de Lille (Lille, France), 2022.

**Collins Erhianoh**, *6 mois*, Stage de Master 2.

“Multi-catalytic hybrid materials (MCHMs) from metal-organic frameworks (MOFs) for biomass valorisation (MARIMBA)”

Centrale Lille (Lille, France), **2022**.

**Fabio Marveux**, *6 mois*, Stage de Master 2.

“Mise au point d’une réaction hybride combinant des CoA ligases et des catalyseurs hétérogènes métalliques pour la formation de liaisons amides”

Université de Lille (Lille, France), **2021**.

**Lucas Anne**, *2 mois*, Stage de Licence 3.

“Production d’enzymes au service de la modification de molécules terpéniques issues de la racine de chicorée ”

Polytech’Nice (Nice, France), **2021**.

**Thomas Guiho-Momo**, *1 mois*, 1<sup>ère</sup> année de diplôme d’ingénieur.

“Criblage de nouveaux synthons biosourcés pour une valorisation par catalyse hybride”

Centrale Lille (Lille, France), **2021**.

**Théo Daboudet**, *6 mois*, Stage de Master 2.

“Criblage d’une collection de souches bactériennes productrices de biosurfactants pour la recherche de lipopeptides à activités antimicrobiennes”

Université de Lille (Lille, France), **2020**.

**Sarra Ben Haj Younes**, *6 mois*, Stage de Master 2.

“Mise au point de nouveaux catalyseurs hybrides pour la valorisation du HMF : Production et caractérisation cinétique des transaminases”

Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT), Université de Carthage, (Tunis, Tunisia), **2020**.

**Ouafik Boudaouch**, *6 mois*, Stage de Master 2.

“Mise au point de cocktails microbiens pour la dégradation de la biomasse lignocellulosique issue de résidus de conifères”

Université de Lille (Lille, France), **2019**.

**Anaëlle Gout**, *6 mois*, Stage de Master 2.

“Synthèses chimiques et évaluation biologique de composés pour des applications dans le domaine agroalimentaire”

Université de Lille (Lille, France), **2019**.

**Laurine Dargaud**, *1 mois*, 1<sup>ère</sup> année de diplôme d’ingénieur.

“Machine learning appliqué à la prédiction d’activités enzymatiques.”

Centrale Lille (Lille, France), **2019**.

**Nastassia Kaugarenia**, *6 mois*, Stage de Master 2.

“Criblage à haut débit de cocktails d’inhibiteurs de phénoloxydases dans le but d’empêcher la mélanose post-mortem chez la crevette *Penaeus monodon*”

Polytech’Lille (Lille, France), **2018**.

**Bruna Furtado**, *2 mois*, Stage de Licence 1.

“Recherche de nouvelles enzymes pour l’acylation du Lévo-glucosan”

Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille (Lille, France), **2018**.

**Mathieu Delaeter**, *2 mois*, Stage de Licence 2.

“Découverte de l’activité d’un laboratoire de recherche sur la catalyse chimique et la biocatalyse et de ses techniques”

Faculté de Gestion, Économie et Sciences, Institut Catholique de Lille (Lille, France), **2018**.

**Anika Mros**, *2 mois*, Stage de césure.

“MALDI TOF MS Automated Methods of Sample Preparation”

Justus-Liebig Universität Giessen (Giessen, Germany), **2018**.

**Neha Rajput**, 6 mois, Stage de Master 2.  
“High-throughput technique for MALDI-Tof bacterial analysis”  
Université de Lille (Lille, France), 2017.

### **Participation à des jurys de soutenances et comités de suivi individuel de thèse**

#### ***Jurys de thèse***

**Léa Goubeyre** – Soutenance le 06 décembre 2021

“Nouvelles transaminases et procédés multienzymatiques innovants pour la synthèse hautement sélective d’amines et d’aminoalcools chiraux”

Encadrement : Pr. Thierry Gefflaut et Dr. Virgil Hélaine  
Université Clermont-Auvergne (Clermont-Ferrand, France).

**Chloé Lelièvre** – Soutenance le 07 décembre 2020

“Formation de liaisons amides par réactions enzymatiques détournées”

Encadrement : Pr. Anne Zapparucha  
université Paris-Saclay (Evry, France).

#### ***Comités de suivi individuel de thèse (CSI)***

**Florian Teuffo**, 1<sup>ère</sup> année, membre extérieur à la discipline (2023)

“Dépolymérisation biologique de la lignine : développement d’un réacteur enzymatique à membrane pour l’obtention d’aromatiques renouvelables”

Encadrement : Pr. René Froidevaux et Dr. Loubna Firdaous  
UMR Transfrontalière BioEcoAgro, Université de Lille (Lille, France).

**Antoine Mallavergne**, 1<sup>ère</sup> année, membre extérieur à la discipline (2023)

“Characterization of metabolism and roles of caffeic acid esters in chicory”

Encadrement : Pr. Jean-Louis Hilbert et Dr. David Gagneul  
UMR Transfrontalière BioEcoAgro, Université de Lille (Lille, France).

### **Activités d’enseignement**

Nombre total d’heures en présentiel (en heures équivalents TD) : 340 h

Cours magistraux & travaux dirigés, **Start&Go "Big Data" : Enzymologie, HTS et traitement des données**, 24h ETD, G1 - Centrale Lille, 2022 ;

Cours magistraux, **Introduction aux stratégies de criblage à haut débit en chimie et biotechnologies**, 4h ETD, Master 1&2 QPAH - Université de Lille, 2022 ;

Cours magistraux, **Stratégies de criblage à haut débit en chimie et biotechnologies**, 8h ETD, Master 2 SAV - Université de Lille, 2021 ;

Cours magistraux & travaux dirigés, **Start&Go "Big Data" : Enzymologie, HTS et traitement des données**, 24h ETD, G1 - Centrale Lille, 2021 ;

Cours magistraux, **Introduction aux stratégies de criblage à haut débit en chimie et biotechnologies**, 4h ETD, Master 1&2 QPAH - Université de Lille, 2021 ;

Cours magistraux, **Stratégies de criblage à haut débit en chimie et biotechnologies**, 8h ETD, Master 2 SAV - Université de Lille, 2020 ;

Cours magistraux & travaux dirigés, **Start&Go "Big Data" : Enzymologie, HTS et traitement des données**, 24h ETD, G1 - Centrale Lille, 2020 ;

Cours magistraux & travaux dirigés, **Start&Go "Big Data" : Enzymologie, HTS et traitement des données**, 24h ETD, G1 - Centrale Lille, 2019 ;

Cours magistraux & travaux dirigés, **Start&Go "Big Data" : Enzymologie, HTS et traitement des données**, 14h ETD, G1 - Ecole Centrale de Lille, 2018 ;

Cours magistraux & travaux dirigés, **Start&Go "Big Data" : Enzymologie, HTS et traitement des données**, 14h ETD, G1 - Ecole Centrale de Lille, 2017 ;

Travaux pratiques, **Chimie organique**, 64h ETD, Polytech'Clermont-Ferrand, 2015 ;

Travaux pratiques, **Chimie organique**, 64h ETD, Polytech'Clermont-Ferrand, 2014 ;

Travaux pratiques, **Chimie organique**, 64h ETD, Polytech'Clermont-Ferrand, 2013.

### Projets financés

Année	Source (agence, collectivité, entreprise, ...)	Intitulé du projet	Nom du coordinateur	Subvention (€)	Rôle dans le projet
2023 - 2027	ANR PRC AAPG 2023	PEECFUEL	Rabah Boukherroub	695 k€ (115 k€ pour l'UCCS)	Responsable scientifique du partenaire UCCS
2023 - 2027	MSCA Doctoral Network 2022	DEMO	Pedro Luis Arias	3,6 M€ (848 k€ pour l'UCCS)	Responsable scientifique du partenaire UCCS
2023 - 2024	PHC Amadeus	Combinator	Egon Heuson & Mélanie Hall	7 k€ (3 k€ pour l'UCCS)	Coordinateur côté français
2022 - 2025	Chaire industrielle ANR-Solvay	PLASTILOOP2.0	Sébastien Paul & Egon Heuson	1,2 M€ (100 % pour l'UCCS)	Coordinateur - Responsable scientifique WP1&2
2019 - 2020	Pré-maturation SATT Nord – BPI - Région	Ins-Spect	Jean-Sébastien Annicotte	83 k€	Ingénieur de recherche - co-inventeur
2019 - 2022	Financement FARE (SNFGE)	DIAGOH	Laurent Dubuquoy	20 k€	Ingénieur de recherche
2018 - 2021	FACCE-Surplus (H2020)	PASS-BIO	Stefan Junne	650 k€ (200 k€ pour l'UCCS)	Co-directeur scientifique - partenaire de l'UCCS
2018 - 2021	Sustain (I-Site ULNE)	HybCat4Bio	Rénato Froidevaux	200k€ (100 % pour BioEcoAgro)	Co-superviseur de la thèse financée
2016 - 2020	CPER (Région Haut-de-France)	Alibiotech	Philippe Jacques	5,3 M€	Responsable scientifique du CPER pour l'Institut Charles Viollette
2016 - 2019	GENESYS (ITE PIVERT)	ESTERS&CAT2	Pascal Fongarland	187 k€ pour BioEcoAgro	Ingénieur de recherche
2017 - 2018	STARTAIRR (Région Haut-de-France)	CockEnzStoc	Renato Froidevaux	100 k€ (100 % pour BioEcoAgro)	Ingénieur de recherche

2015 - 2018	GENESYS (ITE PIVERT)	Glycybride	Mickael Capron	200 k€ pour BioEcoAgro	Ingénieur de recherche
-------------	----------------------	------------	----------------	------------------------	------------------------

## Organisation de congrès

### *Congrès à portée internationale*

1. BioTrans 2023, 25-29/06/2023, La Rochelle, France ;
2. HTCD2021, 14-15/06/2021, On-Line, France.

### *Congrès à portée nationale*

1. JCC2022, 07-08/04/2021, Villeneuve D'Ascq, France.

## Responsabilités et actions pour la communauté scientifique

2023 – aujourd'hui : Expert nommé au groupe de réflexion européen "Knowledge Exchange" - FAIR Data and Software supporting Reproducible Research (FDSR)

2022 – aujourd'hui : Ambassadeur de l'archive ouverte HAL

2022 – aujourd'hui : Membre du conseil d'administration de la division transversale Chimie durable de la Société Chimique de France

2021 – aujourd'hui : Membre du CoSO (Comité pour la Science Ouverte) - collège Publications

2021 – aujourd'hui : Membre du conseil d'administration du CBSO (Club de Biocatalyse en Synthèse Organique)

## Prix et distinctions

16/06/2022 – Prix Marcel LONCIN du jeune chercheur, décerné par l'ACIA IAA

06/06/2014 – Prix du meilleur poster au congrès CBSO2014

## Vulgarisation scientifique

- Participation à la vidéo "POURQUOI SE FORMER AU DÉPÔT DANS HAL ?" (2022) ;
- Participation à la vidéo du Passeport pour la science ouverte "LA GESTION DES DONNÉES ET LE CYCLE DE VIE DES DONNÉES DE LA RECHERCHE" (2022) ;
- Intervenant puis co-organisateur du cycle de conférences "Les Mardis de la Chimie Durable" de la Société Chimique de France (2022 – aujourd'hui) ;
- Intervention dans le cadre des Déclics (Dialogues Entre Chercheurs et Lycéens pour les Intéresser à la Construction des Savoirs) (2022) ;
- Organisation de rencontres d'échanges avec les citoyens dans le cadre du projet européen FACCE-Surplus "PASS-BIO" : 1 événement à Berlin (2019) et 2 événements (2019 et 2021) avec les habitants du quartier des "Bois Blancs" à Lille pour leur expliquer les concepts et les résultats du projet, mais aussi pour recueillir leurs questions et suggestions quant à l'articulation du projet avec la société civile ;
- Participation à la table ronde "Rencontres Entrepreneurs et Territoires autour des enjeux de la bioéconomie" organisée par Eura Industry Innov' pour apporter le point de vue de la recherche académique sur les activités de bioéconomie dans le Nord de la France, 04/02/2020, Château de Morbecque, France ;
- Membre puis président du comité de pilotage de l'association BeyondLab Lille : Association de vulgarisation scientifique et de mise en relation des chercheurs et du grand public (2017 - 2019).

### **Autres activités**

- Correspondant Science Ouverte de l'UCCS (2022 – aujourd'hui) ;
- Webmaster du site de CBSO (2018 – aujourd'hui) ;
- Webmaster du site de l'Institut Charles Viollette (2018 – 2021) ;
- Responsable de la communication de l'Institut Charles Viollette (2018 – 2021) ;
- Webmaster du site REALCAT (2016 – 2021).



## Résumé de mes travaux passés et présents

### Axe 1 : Recherche de nouvelles enzymes et applications en biocatalyse

Laboratoires :	Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF) UMR Transfrontalière BioEcoAgro
Collaborateur·ice·s principaux·ales	Pr. Thierry Gefflaut (Directeur de thèse, ICCF) Pr. Véronique De Berardinis (Génoscope) Dr. Christine Hélaïne (ICCF) Pr. Rénato Froidevaux (BioEcoAgro)
Nombre total de publications :	9 (dont 3 en 1 <sup>er</sup> auteur et 1 en auteur de correspondance) + 1 chapitre d'ouvrage (1 <sup>er</sup> auteur)
Communications orales :	2 internationales + 1 nationale

Ce premier axe détaillera mes activités de recherche autour de la recherche de nouvelles enzymes par exploration de la biodiversité et de l'application de ces enzymes, seules ou en cascade, pour la synthèse de nouvelles molécules pour la chimie. Cette thématique de recherche est la première que j'ai historiquement développée, et elle se trouve toujours au centre de la majorité de mes projets de recherche actuels, notamment en me donnant accès à un panel de familles d'enzymes utilisables en synthèse, lesquelles seront détaillées tout au long de ce chapitre.

#### Thématique 1.1 : recherche de nouvelles transaminases issues de la biodiversité pour la synthèse d'amines chirales

Les transaminases (TA), aussi communément dénommées aminotransférases, sont des enzymes ubiquitaires appartenant à la classe des transférases et, plus particulièrement, à la famille des enzymes à phosphate de pyridoxal (PLP) ou vitamine B6. Ces enzymes utilisent le PLP comme cofacteur afin de catalyser le transfert réversible d'un groupement amino d'un substrat donneur d'amine, sur le groupement carbonyle d'un substrat accepteur (Figure 1).

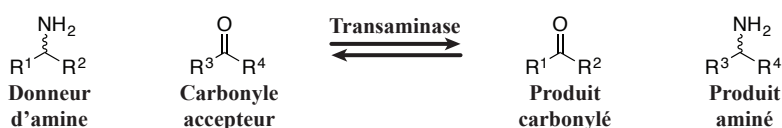


Figure 1 : Réaction de transamination.

Cette famille d'enzymes est très largement utilisée en biocatalyse pour la synthèse d'amines chirales, ces dernières étant impliquées dans bon nombre de voies d'obtention de composés à activité biologique (produits pharmaceutiques et cosmétiques). Aussi trouver de nouvelles TA capables d'accepter des substrats non-naturels est un défi que plusieurs équipes de recherche en biocatalyse tentent de relever par l'utilisation de différentes approches.<sup>1-3</sup> On peut citer la recherche *in silico* de ces nouvelles enzymes par prédiction de leur activité à partir de leur séquence peptidique, l'évolution dirigée et le design rationnel de nouvelles enzymes, ou encore l'exploration de la biodiversité pour trouver de nouvelles TA exhibant des propriétés recherchées pour des applications en synthèse.

C'est cette dernière approche qui a constitué le cœur de mes travaux de thèse, et que je poursuis encore à l'heure actuelle. Notre stratégie repose sur l'élaboration d'une nouvelle méthodologie de recherche basée

sur le développement de nouveaux tests spectrophotométriques automatisés et sur leur mise en œuvre pour le criblage de trois banques d'enzymes jusque-là constituées, regroupant au total plus de 1500 séquences. Dans le cadre de ma thèse, cette étude a été découpée en 4 parties majeures : 1) la synthèse des substrats des TA utilisés pour l'élaboration des tests et le criblage des banques d'enzymes, 2) la mise au point des tests de criblage des TA, 3) la création et la production des trois banques de TA issues de la biodiversité, et 4) le criblage effectif de ces banques suivi par l'utilisation en synthèse biocatalytique des « hits » obtenus.

### Synthèse organique des cétoacides et cétones utilisées pour le criblage des banques de transaminases

Pour cette étude nous nous sommes, dans un premier temps, concentrés sur la recherche d' $\alpha$ -transaminases ( $\alpha$ -TA), capables de convertir des  $\alpha$ -cétoacides en  $\alpha$ -aminoacides. J'ai donc commencé ma thèse par la synthèse de nouveaux  $\alpha$ -cétoacides naturels et non-naturels en vue de leur criblage (Figure 2), ces derniers n'étant pas commerciaux. Pour cela, j'ai dû mettre au point plusieurs voies de synthèses en chimie organique, ayant abouti à la production de 8 composés : l'acide 2-oxo-4-phénylbutanoïque (OPBA), l'acide 3-hydroxy-2-oxobutanoïque (HOBA), l'acide 3-hydroxy-4-méthyl-2-oxopentanoïque (HMOP), l'acide 3-hydroxy-2-oxo-3-phénylpropanoïque (HOPP), l'acide 4-hydroxy-2-oxopentanoïque (HOP), l'acide 4-hydroxy-2-oxo-4-phénylbutanoïque (HOPB), l'acide 3,3-diméthyl-2-oxopentanedioïque (DMOP) et l'acide 2-(carboxycarbonyl)-4-oxoazetidine-3-carboxylique (COC). La majorité de ces synthèses n'était pas décrite dans la littérature mais, après optimisation, la plupart des  $\alpha$ -cétoacides ont pu être isolés avec des rendements globaux compris entre 8 % et 46 %. Ceux n'ayant pas pu être isolés, à cause de leur importante instabilité sur silice, ont été utilisés sous la forme de bruts réactionnels après que leur prédominance en solution a été confirmée par RMN  $^1\text{H}$ . A noter que le COC n'a pas pu être obtenu en quantité suffisante que pour pouvoir être intégré au panel de substrats utilisé pour les criblages. Enfin, j'ai synthétisé un dernier composé durant ma thèse, la 1-hydroxy-3-phénylpropan-2-one (HPPO), cette dernière ayant fait partie d'un panel de substrat destiné à rechercher non plus des  $\alpha$ -TA, mais des amine-transaminases (amine-TA) au sein des deux dernières banques d'enzymes que j'ai eu l'occasion de créer.

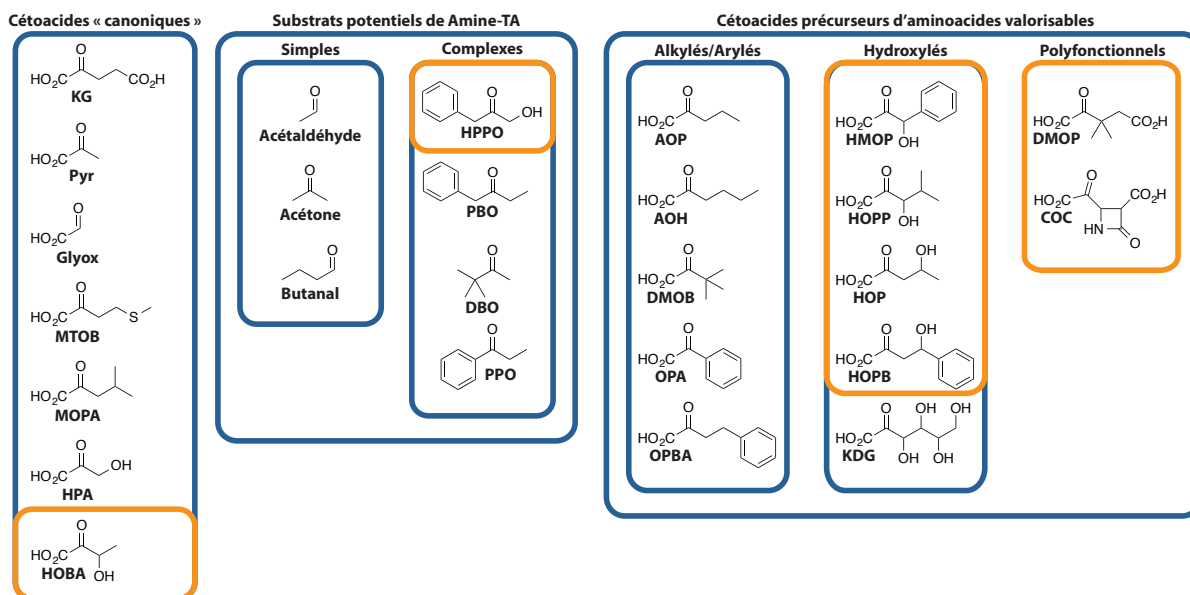


Figure 2 : Liste des  $\alpha$ -cétoacides et autres composés carbonyles utilisés durant ma thèse pour le criblage des nouvelles transaminases. Sont entourés en orangé ceux pour lesquels j'ai mis au point une nouvelle voie de synthèse.

En plus de ces accepteurs carbonylés, j'ai mis au point la synthèse de trois nouveaux donneurs d'amine sulfoniques ayant servi à la mise au point de mes nouveaux tests de criblages à haut débit (Tableau 1) : le *L*- et *D*-acide cystéine sulfonique (ACS), l'hypotaurine (HPT), et la (*R*)- et (*S*)-méthylhypotaurine (MHPT). La synthèse de l'ACS était déjà décrite dans une très ancienne publication,<sup>4</sup> et il m'a été possible de l'obtenir dans de grande quantité après une rapide optimisation de cette dernière. Les synthèses conduisant à l'hypotaurine et à la méthylhypotaurine n'étaient en revanche pas décrites, et il m'a donc fallu les mettre au point. Là encore, j'ai pu obtenir les composés attendus dans des quantités suffisantes pour la mise au point et la réalisation des criblages, avec de très bonnes puretés.

Tableau 1 : Liste donneurs d'amine synthétisés par chimie organique durant ma thèse.

Acide cystéine sulfonique (ACS)	Hypotaurine (HPT)	Méthylhypotaurine (MHPT)

### Mise au point de nouveaux tests spectrophotométriques universels pour le criblage de transaminases

Afin de pouvoir cribler nos futures banques d'enzymes, nous a fallu mettre au point plusieurs nouveaux tests de criblage colorimétrique universel pour les transaminases. Ces tests sont basés sur l'utilisation d'un donneur d'amine de type  $\beta$ -aminosulfonique ( $\beta$ AS). Ces composés, comme l'ACS, conduisent par transamination, à la formation d'un acide  $\beta$ -cétosulfonique qui se décompose spontanément dans le milieu en produisant un dérivé carbonylé et du SO<sub>2</sub> (Figure 3).

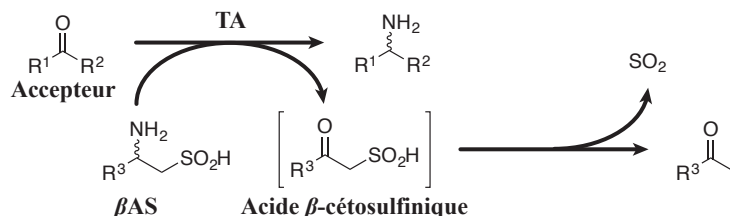


Figure 3 : Utilisation d'un  $\beta$ AS comme donneur pour les réactions de transamination.

L'hydratation rapide du SO<sub>2</sub> conduit à des ions sulfite qui peuvent être facilement dosés à l'aide de plusieurs réactifs chimiques comme le réactif d'Ellman (Acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque), DTNB). En plus du déplacement d'équilibre et du suivi colorimétrique lié à l'utilisation du  $\beta$ AS, ce test, qualifié de « *direct* », offre une totale liberté concernant le choix du substrat accepteur. Il est donc possible de tester une variété de cétones, d'aldéhydes ou de cétoacides et par conséquent d'étudier des  $\alpha$ -TA ou des amine-TA suivant le donneur choisi. Ce test direct est en revanche limité aux TA acceptant un  $\beta$ AS comme substrat donneur d'amine, appelées  $\beta$ ASTA. Pour rendre notre méthode applicable à d'autres TA, j'ai développé un second test, dénommé « *test couplé* », qui utilise un donneur d'amine primaire communément accepté par les  $\alpha$ -TA ou les amine-TA. Ce donneur est régénéré *via* une réaction auxiliaire de transamination utilisant un  $\beta$ AS comme donneur et une  $\beta$ ASTA, comme enzyme auxiliaire. Ce couplage permet ainsi le suivi de la réaction principale avec le DTNB. Ce test permet donc l'étude des TA n'acceptant pas le  $\beta$ AS comme donneur et il est à ce titre tout à fait complémentaire au test direct. Enfin, en choisissant des donneurs de configuration stéréochimique inverse pour ces deux tests, il est possible de les utiliser avec des enzymes présentant des stéréosélectivités différentes, ce qui rend notre nouvelle méthode applicable à l'ensemble des TA (Figure 4).

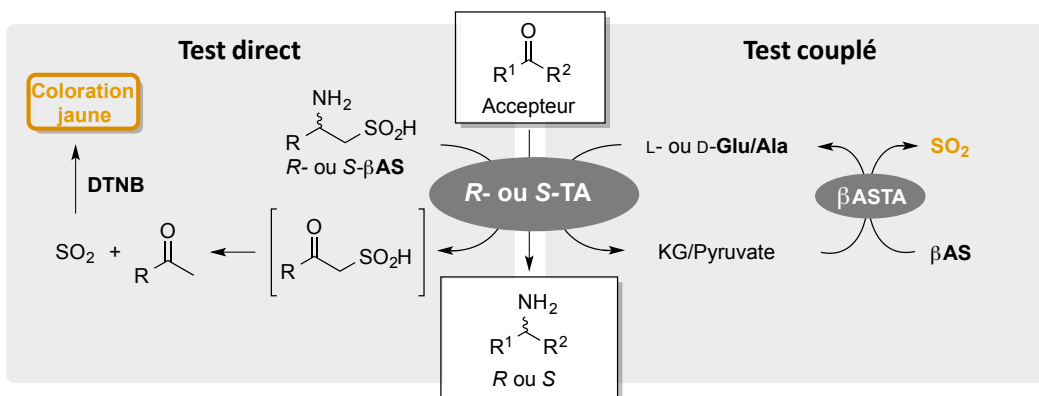


Figure 4 : Tests universels pour les transaminases basés sur l'utilisation d'un donneur de type  $\beta$ AS pour le déplacement de l'équilibre réactionnel et la détection spectrophotométrique de l'activité des enzymes.

Ce test a été mis au point à la paillasse, et adapté à haut débit à l'aide d'un robot TECAN Evo 150. D'excellentes limites de détection et de quantification ont pu être mesurées, en faisant un outil efficace pour la recherche d'activités transaminases, même faibles, au sein de banques d'enzymes. Cette mise au point et son application à la recherche de transaminases avec l'ACS comme donneur ont conduit à la rédaction d'un chapitre d'ouvrage dans *Protein Engineering: Methods and Protocols - Methods in Molecular Biology* édité par Springer New York en 2018.<sup>5</sup> En plus de ce premier test, j'ai élaboré plusieurs autres tests de criblage pour les transaminases durant ma thèse, avec notamment un test basé sur l'utilisation de la résazurine, et du couple glutamate déshydrogénase/diaphorase pour le criblage de donneur d'amines cette fois. Ces tests nous ont ainsi permis de réaliser la caractérisation fine de la promiscuité des donneurs naturels des transaminases découvertes durant la thèse comme cela sera détaillé par la suite.

### ***Conception et production de 3 banques de transaminases regroupant plus de 1500 nouvelles séquences issues de la biodiversité***

Ayant à notre disposition plusieurs tests de criblages efficaces, ainsi qu'un panel de substrats à tester, nous nous sommes ensuite concentrés sur la conception des banques d'enzymes que nous allions cribler pour rechercher de nouvelles transaminases. Pour cela nous avons choisi d'utiliser une approche d'exploration génomique. Compte tenu de la diversité microbienne et de la part probablement infime des organismes qui ont été décrits à ce jour, il est raisonnable de postuler qu'une très grande variété d'enzymes, optimisées au cours de milliards d'années d'évolution, reste encore à découvrir. Par ailleurs, les progrès des dernières décennies dans le domaine du séquençage ont conduit à une accumulation sans précédent de séquences dans les bases de données génomiques. L'exploration de ces mines de gènes apparaissait donc comme une voie pertinente pour identifier de nouvelles enzymes avec des propriétés originales et valorisables. Cette démarche n'était pas nouvelle et avait déjà pu être testée par l'équipe de la Pr. Véronique De Berardinis (Génoscope) pour l'élaboration de banques visant d'autres familles d'enzymes. Nous nous sommes donc associés à cette équipe pour la création de banques de transaminases en participant à l'optimisation de cette méthode en vue de la recherche de transaminases. Globalement, l'approche que nous avons utilisée repose sur la création de banques de protéines présentant une identité modérée entre elles et avec des enzymes bien décrites et caractérisées, ces dernières possédant des activités proches de celles qui sont recherchées. En bref, cette démarche repose sur le postulat que des enzymes proches en termes de séquences, auront des activités enzymatiques également proches. La création de ces banques d'enzymes s'est décomposée en 4 étapes (Figure 5) :

- 1) Création d'un set de référence regroupant des enzymes bien caractérisées expérimentalement et qui possèdent des activités similaires à celles qui sont recherchées.
- 2) Sélection de toutes les séquences protéiques présentes dans les bases de données et possédant un certain taux d'identité avec les enzymes du set de référence.
- 3) Réduction du nombre de séquence par « *clustering* », c'est-à-dire en regroupant les séquences semblables et en sélectionnant un nombre limité de candidats par groupe (« *cluster* »).
- 4) Clonage et surexpression des séquences sélectionnées.

Le criblage de ces banques en utilisant des méthodes adaptées, permet ensuite de détecter les activités enzymatiques recherchées.

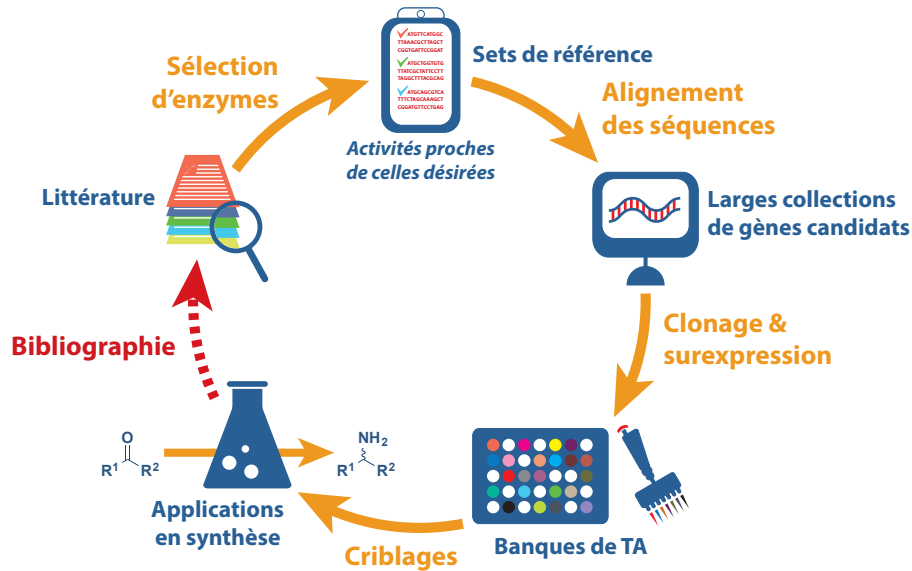


Figure 5 : Stratégie d'exploration génomique des bases de données protéiques internationales, basée sur le postulat qu'une homologie de séquence entraîne une homologie d'activité catalytique.

En utilisant cette approche nous avons été en mesure de produire 3 banques de transaminases, TAM(A), TAM(C) et TAM(D), contenant respectivement 463, 372, et 837. Au final, après vérification TAM(A), TAM(C) et TAM(D) contenaient respectivement 232, 180, et 375 enzymes correctement surexprimées. Après une analyse de l'homologie des séquences présentes au sein de chaque banque, des taux moyens d'homologie de respectivement 14 %, 26 % et 30 % ont été calculés, démontrant la diversité enzymatique présente au sein de ces banques. Toutes les enzymes ont été ainsi produites sous la forme de lysats cellulaires en vue des criblages robotisés. Concrètement, concernant la création des banques, je me suis personnellement chargé de la revue de la littérature dans le but de trouver les enzymes constituant les différents sets de références, ainsi que d'effectuer les statistiques et la vérification des séquences des banques une fois produites. L'alignement des séquences dans les bases de données, ainsi que le clonage et la surexpression de celles choisies pour constituer les banques, ont été réalisés par le Génoscope à l'aide de leur *workflow* bio-informatique.

### ***Criblage automatisé des banques de transaminases avec les tests $\beta$ AS***

Tous les éléments nécessaires aux criblages des banques étant en ma possession, j'ai pu transposer les méthodes établies jusque-là sur le robot de pipetage (TECAN Evo 150) présent à l'ICCF afin de cribler mes

différentes banques avec les substrats donneurs et accepteurs sélectionnés. Pour cela j'ai programmé une routine robotisée qui effectuait les actions suivantes (Figure 6) :

- 1) Prise en charge des plaques contenant les enzymes produites.
- 2) Ajouts des substrats et réactifs nécessaires à la réalisation des tests de criblage.
- 3) Incubation et lecture spectrophotométrique automatisée des plaques afin de mesurer les cinétiques enzymatiques.

Afin des traiter rapidement et efficacement les résultats issus des criblages, il m'a aussi fallu coder un programme informatique permettant la transformation des données brutes en données d'activités enzymatiques comparables, intégrant au passage deux seuils statistiques de vérification des données. Ce programme a aussi permis d'intégrer à ces résultats les informations phylogéniques des enzymes contenues dans mes banques, et de les utiliser pour mettre en lumière des relations structures-activités entre ces dernières et leurs substrats.

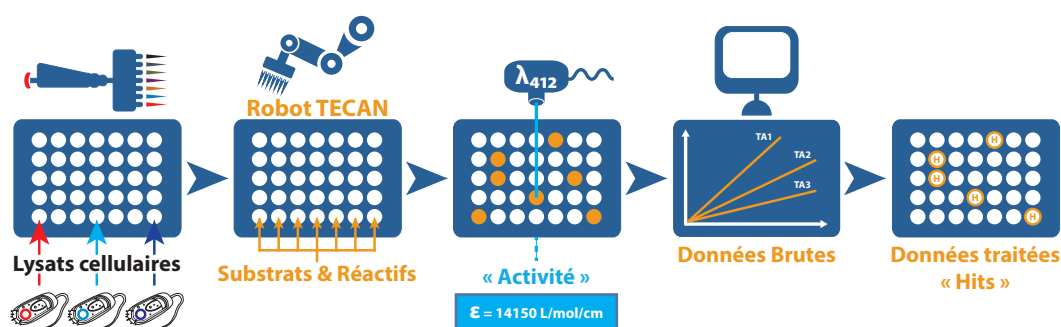


Figure 6 : Étapes effectuées automatiquement pour le criblage de la banque de transaminase, de la préparation des tests avec le robot TECAN, jusqu'au programme informatique pour le traitement des données.

Au total, plus de 50000 tests enzymatiques ont été réalisés durant ma thèse. De la première banque TAM(A), 24 nouvelles  $\alpha$ -TA, jamais décrites jusqu'alors, ont pu être identifiées pour leur large spectre de substrats accepteurs, faisant d'elles des outils particulièrement efficaces pour la synthèse d'acides aminés non naturels. Ces enzymes ont pu être produites et complètement caractérisées (spectres de substrats donneurs et accepteurs, thermostabilité, résistance aux solvants, etc.). Plusieurs d'entre-elles ont par la suite été utilisées pour des premières applications en synthèse de composés à haute valeur ajoutée comme la *L*- et *D*-homophénylalanine qui seront détaillées plus loin dans ce document. À celles-ci viennent s'ajouter plusieurs autres enzymes sélectionnées plus spécifiquement pour leur capacité à accepter des substrats bien précis, comme la *L*- ou *D*-sérine, afin de pouvoir réaliser des tandems catalytiques avec d'autres familles d'enzymes comme les aldolases et les transcétolases. Ces travaux seront aussi détaillés peu après dans ce document. Le criblage de la banque TAM(A) a donné lieu à une première publication dans le journal *Applied Microbiology and Biotechnology* en 2016.<sup>6</sup> À noter qu'à la fin de ma thèse, le criblage des banques TAM(C) et TAM(D) n'était pas terminé, ce travail ayant été repris depuis par la doctorante du Pr. Thierry Gefflaut (Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, ICCF), la Dr. Léa Gourbeyre, qui m'a succédé. Les résultats de mes criblages ajoutés au siens ont permis de découvrir une nouvelle série d'amine-TA donnant lieu à une seconde publication dans le journal *Catalysis Science and Technology* en 2021, en utilisant cette fois les tests à l'hypotaurine et à l'alanine à la place de l'ACS et du glutamate respectivement.<sup>7</sup>

## ***Application des nouvelles transaminases pour la synthèse d'acides aminés non naturels à haute valeur ajoutée***

Ayant découvert plusieurs nouvelles transaminases possédant des spectres de substrats atypiques, j'ai terminé mon travail de thèse avec l'application de plusieurs d'entre elles pour la production de l'homophénylalanine (Hfe). Cet acide aminé non naturel est notamment impliqué dans la synthèse de plusieurs médicaments comme le carfilzomib, utilisé pour de la thérapie ciblée anticancéreuse, ou encore l'énalapril, un médicament anti-hypertension. Ce travail a été effectué dans le cadre du stage de Master 2 de Thomas Talbot, étudiant pharmacien. Pour réaliser les synthèses, nous avons sélectionné 3 TA qui avaient révélé de bonnes activités envers le cétoacide correspondant, l'OPBA. Ces trois enzymes ont pour numéro d'accèsion [UniProt](#) Q5N2G0, G0VQA2 et E6LHY8. Un premier essai de synthèse a été effectué avec la *L*-α-TA Q5N2G0 et le couple glutamate déshydrogénase/formiate déshydrogénase pour la régénération du donneur d'amine. Outre la nécessité d'utiliser trois enzymes et un cofacteur coûteux pour cette synthèse, nous avons pu obtenir la *L*-Hfe avec un rendement élevé de 95 % (39 % après purification). Nous avons ensuite utilisé la capacité de deux autres de nos nouvelles transaminases, la G0VQA2 et la E6LHY8, à accepter la glutamine comme donneur d'amine afin d'obtenir de meilleurs rendements réactionnels tout en s'affranchissant des enzymes auxiliaires et cofacteurs pour le déplacement d'équilibre. Une fois transaminée, la glutamine conduit en effet à la formation de 2-oxoglutaramate (2OG) un cétoacide qui se cyclise spontanément dans le milieu avec une constante d'équilibre que nous avons démontré comme étant largement en faveur de la forme cyclique (> 99,5 %). La forme cyclique n'étant pas rétrotransaminable, ce donneur permet donc de déplacer l'équilibre réactionnel largement en faveur de la formation des produits (Figure 7).

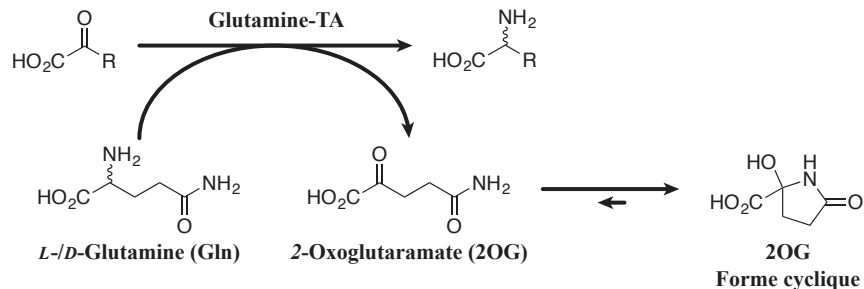


Figure 7 : Procédé de déplacement d'équilibre utilisant la glutamine comme donneur d'amine pour la synthèse d'acides aminés.

Exploitant donc cette capacité en synthèse, nous avons réalisé la synthèse de la *L*- et *D*-Hfe respectivement avec les TA G0VQA2 et E6LHY8 et la glutamine comme donneur. Nous avons ainsi pu obtenir le produit avec des rendements respectifs de 93 % et 96 % (*ee* > 99,9 %) en utilisant seulement un léger excès de donneur. Ces synthèses ont pu être effectuées à une échelle de 100 mM, ce qui est très prometteur pour une application industrielle. Ce procédé a alors été étendu à la synthèse d'autres acides aminés non naturels comme l'homoalanine (Hal) et la *tert*-leucine (Tle), eux aussi utilisés comme synthons pour la synthèse de molécules bioactives. Ces composés ont pu être obtenus avec des rendements équivalents à ceux décrits pour l'Hfe. Ces résultats (Figure 8), ainsi que le développement de la nouvelle stratégie de déplacement d'équilibre, ont donné lieu à une publication dans le journal *Advanced Synthesis & Catalysis* en 2019.<sup>8</sup>

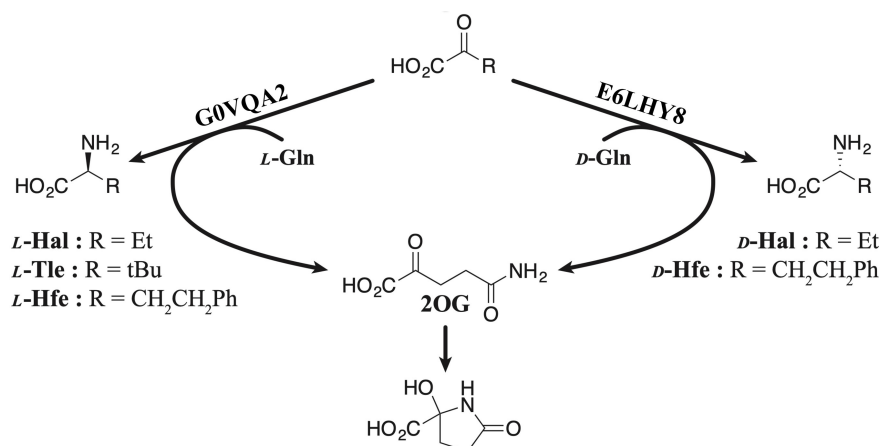


Figure 8 : Synthèse de la *L*-/*D*-Hfe, de la *L*-/*D*-Hal et la *L*-Tle à l'aide de deux transaminases découvertes durant ma thèse utilisant la glutamine comme donneur d'amine pour le déplacement d'équilibre.

**Résumé de ma contribution :** Au cours de ce projet j'ai été impliqué dans l'ensemble des étapes menées : synthèse organique, conception des banques par bio-informatique, programmation du robot, programmation informatique, calculs statistiques, et caractérisation enzymatique des *hits*. J'ai effectué l'ensemble des parties expérimentales, à l'exception des banques d'enzymes, pour lesquelles je n'ai pas réalisé moi-même l'alignement et la récupération des séquences, ainsi que la production des lysats cellulaires contenant les enzymes criblées. J'ai également été amené à co-encadrer plusieurs étudiant·e·s en stage avec mon directeur de thèse, ce qui m'a fortement donné goût à la supervision de jeunes chercheur·se·s.

## Thématique 1.2 : développement de cascades enzymatiques pour la synthèse de nouveaux composés à haute valeur ajoutée

### *Boucles enzymatiques aldolases-transaminases autonomes pour la synthèse d' $\alpha$ -aminoacides $\gamma$ -hydroxylés*

Une seconde application de ces nouvelles transaminases fut la mise au point de tandems catalytiques combinant plusieurs de celles-ci avec des enzymes de la famille des aldolases. Les aldolases sont des enzymes appartenant à la classe des lyases, qui réalisent comme leur nom l'indique des réactions d'aldolisation. Elles catalysent ainsi l'addition d'un aldol « *donneur* » nucléophile sur un « *accepteur* » électrophile, les deux adduits étant bien souvent de type  $\beta$ -hydroxycarbonyle. De nombreuses aldolases ont été étudiées en synthèse, notamment par l'équipe de la Pr. Marielle Lemaire (ICCF), qui travaille activement avec Thierry Gefflaut.

Ayant découvert durant les criblages des TA capables de convertir des cétoacides  $\gamma$ -hydroxylés en aminoacides correspondants, nous avons cherché à les utiliser en synthèse pour cette fonction. Seulement, comme j'ai pu le mentionner plus tôt, ces cétoacides ne sont pas commerciaux. Une voie de synthèse possible consiste alors en une réaction d'aldolisation entre le pyruvate et l'aldéhyde correspondant au groupement à introduire. Une telle réaction peut être réalisée en biocatalyse avec des pyruvate aldolases (PyrAL) acceptant le pyruvate comme donneur (Figure 9).<sup>9,10</sup>



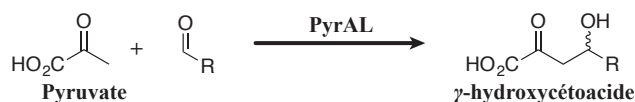


Figure 9 : Synthèse de  $\gamma$ -hydroxycétoacides par aldolisation entre le pyruvate et un aldéhyde grâce à une PyrAL.

Or, plusieurs enzymes de ce type avaient justement été découvertes par l'équipe de Marielle Lemaire lors d'un précédent criblage de la biodiversité similaire à celui que j'ai mis en place pour mes transaminases. Nous avons sélectionné 19 de ces PyrAL selon leur capacité à accepter un large spectre d'aldéhydes électrophiles et les avons couplées l'aspartate-transaminase d'*Escherichia coli* (AspTA) pour la synthèse du 4-hydroxyglutamate (HGlu) selon une cascade autonome n'utilisant que l'aspartate et du glyoxylate comme substrats de départ (Figure 10). À noter que pour que ce tandem catalytique puisse démarrer une quantité catalytique en pyruvate doit elle aussi être introduite en début de réaction.

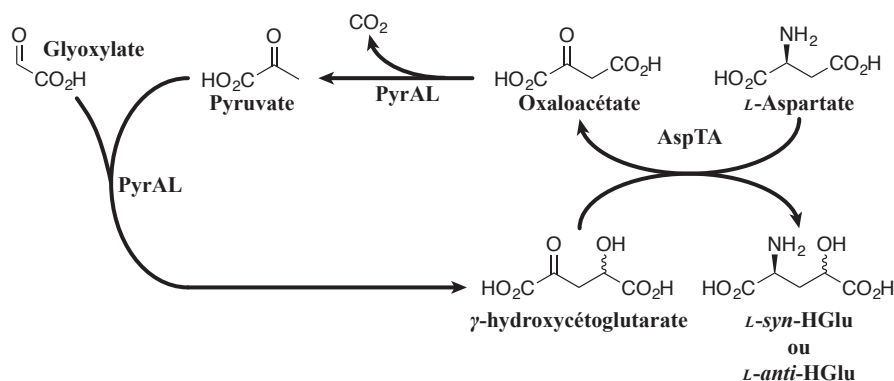


Figure 10 : Boucle AL-TA permettant la synthèse de *L-syn*-HGlu ou de *L-anti*-HGlu grâce à partir de *L*-aspartate et glyoxylate, catalysée par la combinaison d'une PyrAL et de l'AspTA.

Un intérêt majeur de cette boucle concerne le mécanisme de déplacement d'équilibre mis en œuvre, qui repose sur la capacité de la PyrAL à décarboxyler en pyruvate l'oxaloacétate issu de la transamination de l'aspartate, empêchant sa rétrotransamination, le pyruvate n'étant pas substrat de l'AspTA. Différents tandems enzymatiques ont ainsi été mis en œuvre, et le rendement en HGlu a été déterminé au bout de 24 h, tout comme la configuration *syn* ou *anti* du produit formé. A l'issue de ce criblage, 6 couples AspTA-PyrAL ont montré des conversions supérieures à 60 %, et deux PyrAL (Uniprot Id. A0A081HJP9 de *Pseudomonas aeruginosa* et B7NJZ1 d'*Escherichia coli*) ont conduit à l'obtention du *L-syn*-HGlu et du *L-anti*-HGlu, respectivement, de manière presque exclusive. Ces deux enzymes ont ensuite été utilisées pour l'optimisation des boucles, aboutissant au final à la production de *L-syn*-HGlu et *L-anti*-HGlu avec des rendements de 92 % et 95 % respectivement, et un rapport diastéréoisomérique > 98/2 dans les deux cas.

Ce concept a par la suite été étendu à la synthèse de 2,5-dihydroxynorvaline (DHNV), un aminoacide non naturel utilisé comme intermédiaire pour la synthèse d'antibiotiques comme la clavalanine et l'échinocandine. Pour cela, les deux précédentes aldolases ont été couplées avec les transaminases G0VQA2 et E6LHY8 décrites précédemment selon un schéma réactionnel similaire utilisant cette fois l'alanine et le glycolaldéhyde comme substrat de départ (Figure 11). Des taux de conversion entre 42 % et 65 % ont été observés et la *L-syn*-DHNV et la *D-anti*-DHNV ont pu être respectivement obtenues avec des rapports diastéréoisomériques de 89/11 et 92/8. La *L-anti*-DHNV et la *D-syn*-DHNV n'ont en revanche pas pu être obtenues avec de bons rapports diastéréoisomériques dans ces conditions. Pour finir, les conditions réactionnelles du tandem impliquant la TA E6LHY8 et la première aldolase (A0A081HJP9) ont été

optimisées de manière à obtenir un rendement supérieur en *D-anti*-DHNV à hauteur de 100 mM en réactifs. Cette dernière étude a permis d'aboutir à un rendement final de 83 % en *D-anti*-DHNV, avec un rapport diastéréoisomérique de 93/7. L'ensemble de ces résultats a conduit à la publication d'une communication dans le journal *Chemical Communications* en 2017.<sup>11</sup>

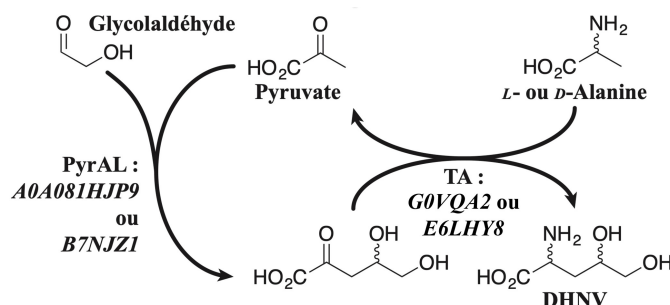


Figure 11 : Synthèse de des 4 diastéréoisomères de la DHNV à l'aide d'une boucle AL-TA utilisant la *L*- ou *D*-alanine et le glycolaldéhyde comme substrats de départ.

### *Recherche de sérine-transaminases thermostables et développement de cascades enzymatiques transcétolases-transaminases à haute température pour la synthèse de cétooses rares de configuration (3S, 4S)*

Le but de cette troisième étude suivant le criblage de mes banques de transaminases était la recherche de nouvelles sérine-transaminases (SerTA) thermostables. Le but était de pouvoir les utiliser pour la génération de  $\beta$ -hydroxypyruvate (HPA) à partir de la *L*- ou *D*-sérine à haute température (50-60 °C) afin de pouvoir utiliser ce dernier comme donneur pour la synthèse de cétooses de configuration (*3S, 4S*) par couplage avec la transcétolase thermostable de *Geobacillus stearothermophilus* (TK<sub>gst</sub>) (Figure 12). Ce travail a été réalisé dans le cadre du stage de Master 2 de Maxime De Sousa Lopez Moreira, que j'ai supervisé pour la partie recherche des transaminases et de leur application en synthèse.

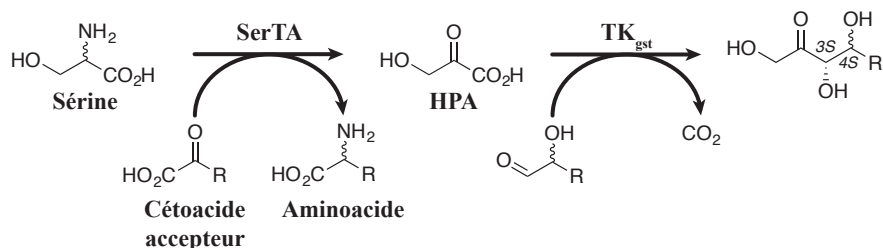


Figure 12 : Couplage de la TK<sub>gst</sub> et d'une SerTA pour la synthèse d'un cétoose de configuration (*3S, 4S*) par génération *in situ* du HPA.

Nous avons dans un premier temps mis au point un nouveau test de criblage permettant de tester l'activité pour la *L*- ou *D*-sérine de 13 transaminases issues de mes précédents criblages et ayant répondu avec le HPA comme cétoacide accepteur. Celui-ci est basé sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium, le WST-1, pour le dosage des composés  $\alpha$ -hydroxycarbonylés comme le HPA. En réagissant avec ce dernier en milieu basique, le WST-1 conduit à la formation d'un composé bleu qui absorbe très fortement à 600 nm (Figure 13).

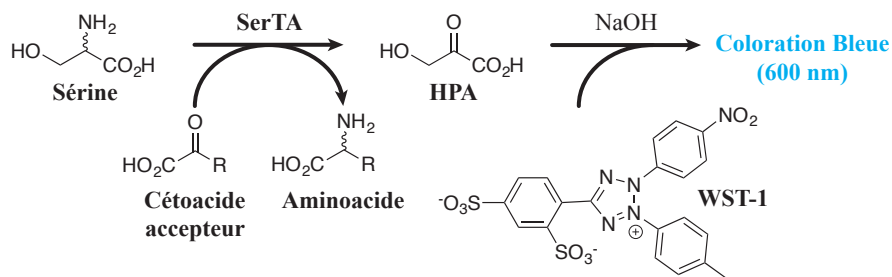


Figure 13 : Test de criblage au WST-1 permettant de mesurer l'activité de transaminases pour la sérine.

Pour mettre en place ce test avec mes TA, trois cétoacides accepteurs ont été sélectionnés : l' $\alpha$ -cétoglutarate (KG), le pyruvate (Pyr) et le glyoxylate (Glyox). Ces accepteurs sont connus pour être couramment acceptés par les *L*- et *D*- $\alpha$ -TA. À l'issue du criblage, la transaminase A1HUC4 a clairement montré une activité supérieure à celle des 12 autres, quel que soit l'accepteur utilisé. Il a été intéressant de constater qu'il s'agissait aussi de l'enzyme la plus active avec le HPA lors du criblage de la banque TAM(A). Cette enzyme a donc été sélectionnée pour la suite du projet. Avant de l'utiliser en synthèse, A1HUC4 a été entièrement caractérisée, afin de connaître ses performances et ses conditions optimales d'utilisation. Les paramètres cinétiques de l'enzyme ont ainsi été mesurés pour les trois cétoacides accepteurs, et la thermoactivité et thermostabilité à 60 °C de l'enzyme a été évaluée. Celle-ci a révélé une thermoactivité maximale à 60 °C comme espéré, et un maintien de plus de 50 % de son activité pendant 10 jours à cette température. Cette nouvelle SerTA thermostable à notre disposition, nous avons testé son couplage avec la TK<sub>gst</sub>. Cette transcétolase, découverte par l'équipe de la Pr. Laurence Hecquet (ICCF), est capable de créer des liaisons C-C entre le HPA et différents aldéhydes polyhydroxylés, conduisant à la formation de sucres de configuration (3*S*, 4*S*) à 60 °C. Nous avons ainsi commencé par coupler ces deux enzymes à 60 °C pour la synthèse de *L*-érythrose à partir de *L*-sérine et de plusieurs cétoacides comme substrats de la TA, et de glycolaldéhyde comme accepteur de la TK (Figure 14). L'analyse des produits par RMN <sup>1</sup>H a permis de confirmer un rendement de 81 % en *L*-érythrose, prouvant la compatibilité des deux enzymes et la possibilité d'utiliser cette TA pour la génération *in situ* du HPA comme donneur de la TK. Suite à cette première étude, la réaction a été optimisée et d'autres aldéhydes accepteurs de la TK ont été testés, aboutissant à l'obtention du *L*-ribulose, du 5-désoxy-*L*-ribulose, du *D*-tagatose, et du *L*-psicose avec des rendements en produits isolés de respectivement 56 %, 98 %, 52 % et 51 % et un excès diastéréoisomérique > 95 %. Ces résultats ont conduit à la publication d'un article dans la revue *Green Chemistry* en 2017.<sup>12</sup>

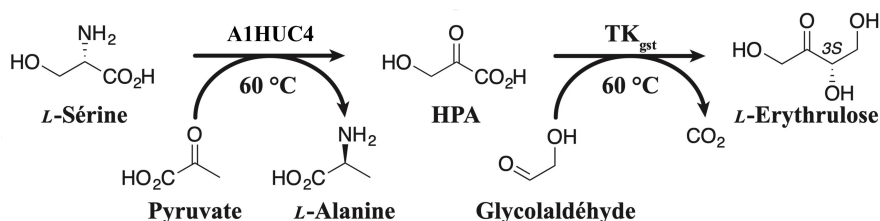


Figure 14 : Couplage de la TA A1HUC4 issue de la banque TAM(A) avec la TK<sub>gst</sub> lors d'une réaction à 60 °C aboutissant à la synthèse du *L*-érythrose.

**Résumé de ma contribution :** Pour les boucles aldolase-transaminase, mon implication a été focalisée sur l'étude des transaminases utilisées pour leur mise au point. J'ai aussi pu réaliser les premiers essais de boucles avec l'AspTA. La poursuite du projet a été effectuée par la Dr. Christine Hélaïne (ICCF), de l'équipe de Marielle Lemaire, et par Thierry Gefflaut. Pour la cascade avec la transcétolase, j'ai participé à la supervision du stagiaire avec lequel nous avons mis au point le test au WST-1, et avons procédé au criblage des enzymes. Je l'ai aussi supervisé lors de la caractérisation fine de la meilleure enzyme sélectionnée, et lors de son application en synthèse afin de tester sa compatibilité avec la TK<sub>gst</sub> pour la synthèse du *L*-érythrose. Le reste des travaux en synthèse a été mené par la Dr. Marion Lorillière, doctorante de Laurence Hecquet, dont la thèse portait sur le développement de nouvelles voies de synthèses impliquant justement la TK<sub>gst</sub>

### **Thématique 1.3 : étude d'autres familles d'enzymes et applications en biocatalyse**

#### ***Utilisation de lipases commerciales pour la valorisation de sous-produits de transformation de la biomasse.***

Dans le cadre du CPER « ALIBIOTECH » (2016-2020), j'ai participé à un projet mené par le Pr. Rénato Froidevaux et le Dr. Abdulhadi Aljawish (UMR Transfrontalière BioEcoAgro, UMRT BioEcoAgro) visant à utiliser différentes lipases commerciales pour l'estérification de l'acide formique issu de l'oxydation du glycérol, comme voie de valorisation industrielle de ce dernier. Celui-ci est en effet le coproduit majoritaire des procédés permettant la production de biodiesel à partir d'huiles végétales, et sa conversion en acides est l'une des voies prometteuses pour sa valorisation dans l'industrie chimique.<sup>13,14</sup> Ce projet s'est d'ailleurs inscrit dans le cadre du développement de la société GECCO en Hauts-de-France qui développe une ligne de production de biodiesel à partir des huiles de fritures usagées de la métropole de Lille, et qui cherchait à réutiliser le glycérol produit en larges quantités. Parmi les différents acides organiques pouvant être obtenus à partir du glycérol, plusieurs collaborateurs de l'Unité de Catalyse et Chimie du Solide (UCCS) ont ainsi démontré qu'il était possible d'obtenir l'acide formique de manière majoritaire à l'aide de différentes nanoparticules métalliques (Au, Pd, Pt et Ag) supportées ou non.<sup>15-17</sup> Celui-ci résulte en effet du niveau d'oxydation maximal du glycérol avant la production de CO<sub>2</sub> et est produit de manière quasi systématique lors du clivage oxydatif des liaisons C-C de ce dernier. Une des voies potentielles de valorisation de cet acide est son estérification avec des alcools gras pour tenter de produire des esters utilisés dans la conception de fragrances pour le domaine de la cosmétique ou de la nutrition.<sup>18</sup> Cependant, jusqu'à notre étude, la synthèse enzymatique d'esters de formiate n'avait été réalisée que par la réaction de transestérification du formiate d'éthyle en formiate d'octyle à l'aide de la lipase B de *Candida antarctica*,<sup>19</sup> ou par la réaction de transformation d'aldéhydes aliphatiques en formiates d'alkyle à l'aide de la Baeyer-Villiger monooxygénase d'*Aspergillus flavus*.<sup>20</sup> Par conséquent, la synthèse enzymatique directe d'esters de formiate à partir de l'acide formique par réaction d'estérification constituait un challenge intéressant. Pour notre étude nous avons donc choisi de cribler plusieurs lipases commerciales pour étudier leur capacité à former les esters correspondants à partir du butan-1-ol et de l'octan-1-ol, si possible à haute concentration voir en conditions sans solvant. Nous avons choisi de nous concentrer sur les lipases commerciales d'une part à cause de leur efficacité et stabilité déjà largement éprouvée dans les procédés faisant intervenir de hautes concentrations en substrat, mais aussi car nous voulions utiliser des catalyseurs facilement accessibles pour une application rapide dans le milieu industriel. Nous avons ainsi criblé plusieurs formulations commerciales de lipases immobilisées (Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica*), Novolime®, Lipozym® RM IM (*Rhizomucor meihei*), Lipozym® TL IM (*Thermomyces lanuginosus*)) et de lipases libres (Novozym®

40116 ; EversaTransform ; Callera® Trans ; Patalase® 2000L ; Lipozym® TL (*Mucor meihei*). Nous avons également ajouté à ce panel plusieurs de leurs équivalents non-fournis sous la forme de préparations prêtes à l'emploi, pour comparaison, sous forme immobilisées (lipases A et B de *Candida antarctica* ; lipase de *Candida rugosa*) ou libres (lipase de *Rhizomucor miehei* ; lipase de *Thermomyces langinosus* ; lipase d'*Aspergillus niger*). Après un premier criblage dans différents solvants (acétonitrile, hexane, acétone et 1,4-dioxane) avec l'acide formique et le butanol à une concentration respective de 0,2 M sur 24 h de réaction à 50 °C (2,5 % w/v ou v/v en enzyme), la Novozyme 435 est celle qui a donné le meilleur rendement en ester (72 %), dans l'acétonitrile. Cette enzyme et ce solvant ont en conséquence été sélectionnés pour la suite des expérimentations, où nous avons cherché à optimiser les concentrations et ratios en substrats et en enzyme, la température de réaction, et le recyclage du catalyseur. Au final, nos résultats ont montré qu'il était possible d'obtenir un rendement proche des 90 % en moins 24 h quelle que soient les conditions, avec ou sans solvant. Les concentrations optimales en acide formique et alcools ont respectivement été déterminées à 0,5 M et 1,5 M dans l'acétonitrile en absence de tamis moléculaire, et 1M en acide formique en système sans solvant, les alcools étant alors utilisés comme solvant. De plus, dans les conditions optimales, la lipase immobilisée a pu être réutilisée en conservant près de 97 % de son activité initiale après le processus de traitement (lavage au n-hexane) sur 6 réactions successives. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* en 2019.

Suite à cette première étude avec des lipases, nous avons voulu voir s'il était possible d'étendre l'utilisation de ces enzymes à la valorisation d'autres coproduits issus de la biomasse. Aussi, dans le cadre de la thèse de Juan Rodriguez Mosheim, que j'ai co-encadrée, nous avons cherché à estérifier les groupements alcools de terpènes naturels, avec comme objectif final l'estérification des lactones sesquiterpéniques (LST) majoritaires contenus dans la racine de chicorée. Cette thèse s'est en effet inscrite dans la continuité d'un partenariat entre l'UMRT BioEcoAgro et l'entreprise Florimond-Deprez, avec laquelle celui-ci a un laboratoire commun depuis longtemps. Florimond-Deprez est un semencier du nord de la France dont l'une des plantes phares est en effet la chicorée industrielle (*Cichorium intybus var. sativum*). De nombreuses études ont ainsi été menées au sein du laboratoire pour tenter de valoriser les différentes parties de la plante notamment pour produire des molécules à plus haute valeur ajoutée. En particulier, dans le cadre du projet au sein duquel s'est inscrite la thèse de Juan, nous nous sommes rapprochés de l'équipe du Pr. Nicolas Willand (Médicaments et Molécules pour agir sur les Systèmes Vivants, M2SV) afin d'étudier la possibilité de fonctionnaliser les lactones sesquiterpéniques de la chicorée, certains représentant de cette famille de molécules ayant déjà démontré des actions antivirales,<sup>21,22</sup> antimicrobiennes,<sup>23,24</sup> et antioxydantes.<sup>25</sup> A ce titre, la thèse de Juan a été jumelée avec celle de Francesca Ruggieri, pour laquelle nous avons obtenu à cette occasion un financement PEARL (Programme for EARly-stage Researchers in Lille) soutenu par l'ANR et les Marie Skłodowska-Curie Actions (H2020). L'objectif de ces deux thèses était donc de 1) produire les 4 lactones sesquiterpéniques majoritaires par extraction à partir de la racine chicorée (thèse de Francesca), 2) fonctionnaliser ces dernières par chimie organique (thèse de Francesca) et 3) par biocatalyse enzymatique (thèse de Juan), puis 4) de mettre au point une méthode de fonctionnalisation biocatalytique directe des extraits de racine sans purification préalable (thèse de Juan). La première étape, réalisée principalement par Francesca, était en effet la condition préalable à toute l'étude, les lactones sesquiterpéniques concernées (la lactucine (Lc), la lactucopirine (Lp), la 11 $\beta$ ,13-dihydrolactucine (DHLc) et la 11 $\beta$ ,13-dihydrolactucopirine (DHLp), Figure 15) valant dans le meilleur des cas plusieurs dizaines de milliers d'euro le gramme.

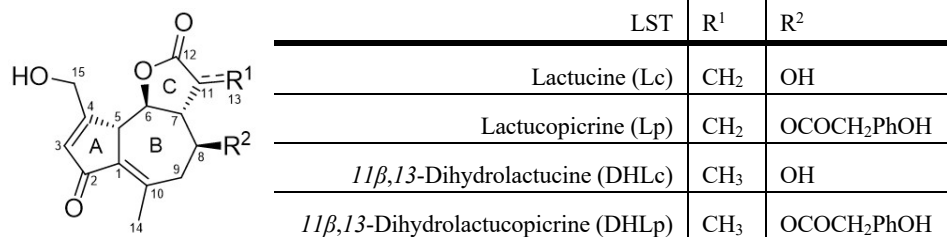


Figure 15 : Squelette guaianolide et structure des principales LST non conjuguées présentes dans la racine de chicorée.

Ceci explique d'ailleurs sûrement l'absence de littérature sur la valorisation par biocatalyse de ces composés. Pourtant l'utilisation d'enzyme pourrait représenter un avantage certain pour leur fonctionnalisation de manière régio- et stéréosélective. En effet, si l'on s'intéresse à l'estérification de ces 4 molécules, la présence de deux fonctions alcools rend cette dernière complexe par chimie organique classique et requière plusieurs étapes de protection/déprotection. Comme l'a montré Francesca durant sa thèse, le caractère nucléophile de l'alcool primaire est effectivement supérieur à celui du second, ce qui lui a permis, après une grosse phase d'optimisation des conditions réactionnelles, d'estérifier presque sélectivement ce dernier (résultats non publiés pour le moment). A l'inverse, elle a montré qu'il était beaucoup plus facile de protéger l'alcool primaire et d'estérifier l'alcool secondaire. C'est pourquoi, avec Juan, nous nous sommes intéressés à tester la capacité de certaines lipases à estérifier l'alcool primaire de manière hautement sélective avec différents donneurs d'acyles. Je précise que nous avons choisi de nous intéresser aux réactions d'estérification en premier lieu car Nicolas Willand avait part d'un intérêt pour la modulation du caractère lipophile des LST, la littérature montrant qu'un accroissement de ce dernier pouvait conduire à une augmentation du caractère biocide de ce type de composés. Notons que bien que les lipases soient déjà la classe d'enzyme la plus utilisée en biocatalyse, aucune étude n'a jusqu'à présent fait état de leur application à la synthèse des esters LST.

Compte-tenu du prix élevé des substrats de départ, et du temps requis pour leur extraction, nous avons commencé par mettre au point nos conditions de synthèse sur un substrat modèle plus facilement accessible. Le monoterpénoïde (*S*)-alcool périllyque (POH) a alors été sélectionné, principalement en raison de la présence d'un groupement alcool allylique similaire à celui des LST, ainsi que de sa bonne disponibilité commerciale. Outre son rôle de substrat modèle pour notre étude, il a déjà attiré l'attention de la communauté pharmaceutique en tant qu'agent anticancéreux potentiel pour le traitement des cancers de l'ovaire, de la prostate, du sein, du pancréas, du poumon et colorectal.<sup>26</sup> De plus, des études récentes ont montré que les tumeurs cérébrales pourraient être l'une des cibles les plus prometteuses de l'alcool périllyque, en particulier par administration intranasale, étant donné sa capacité à pénétrer la barrière hémato-encéphalique.<sup>27,28</sup> En conséquence, des dérivés esters de l'alcool périllyque tels que NEO218 et NEO212 ont déjà été brevetés pour de telles applications pharmaceutiques (Figure 16),<sup>29,30</sup> ce qui fait de ce substrat une deuxième cible intéressante pour notre étude. En outre, la synthèse de dérivés de l'alcool périllyque catalysée par une lipase a également été décrite dans la littérature, principalement l'acylation avec des acides gras à longue chaîne et la préparation d'esters gras de β-D-glucopyranoside de périllyle (PGL) avec des rendements allant de 5.6 % pour l'acide propionique à 82 % avec l'acide décanoïque.<sup>31,32</sup>

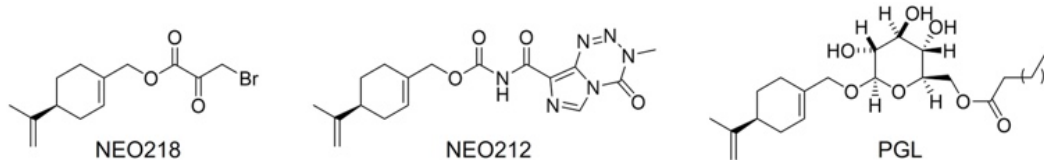


Figure 16 : Exemples de dérivés acylés de l'alcool périllyque trouvés dans la littérature. NEO218 et NEO212 ont été préparés par des procédés non biocatalytiques.

Après avoir criblé de nouveaux plusieurs lipases libres et immobilisées, nous avons sélectionné une fois encore la Novozyme 435 au vu de son activité supérieure et de sa bonne stabilité/recyclabilité. À cette occasion nous avons également testé différents solvants et avons fini par opter pour un mélange méthyl tert-butyl ether (MTBE) / acétonitrile (ACN) : 3/1. Ceci a constitué un bon compromis, l'ACN solubilisant efficacement les quatre LST, l'alcool périllyque, et les donneurs d'acyle sans difficulté, et le MTBE augmentant généralement le rendement de conversion global avec la Novozym 435 d'après nos tests préliminaires. Pour ces tests nous avons choisi d'utiliser l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle afin de maximiser nos chances, l'alcool vinylique produit s'isomérisant spontanément en acétaldéhyde, la volatilité duquel permettant de tirer l'équilibre de la réaction en faveur des produits. Après optimisation des conditions réactionnelles (concentrations en substrats et enzyme, tamis moléculaire, solvant, température) nous avons pu convertir l'intégralité de notre alcool périllyque (ratio 1/3 avec le donneur d'acyle (100/300 mM)) 1 h de réaction (10 mg de Novozym 435 dans 1 mL). Nous avons ensuite comparé ce premier résultat à l'utilisation de l'acide acétique, avec lequel nous n'avons obtenu que 12 % de rendement dans les mêmes conditions et le même temps, démontrant l'intérêt du premier. Cependant, en laissant durer la réaction sur 24 h, nous avons fini par obtenir une production d'acétate de périllyle supérieure à 90 %, ce qui, comparé aux résultats de la littérature sur les esters à courtes chaînes, représentait déjà une très nette amélioration.

Nous nous appuyant sur ces premiers résultats, nous avons ensuite mis au point l'estérification de la DHLc, le premier des 4 LST à avoir été purifié en quantité suffisante par Francesca. En utilisant 2 mg d'enzyme (1 mL de milieu réactionnel) nous avons réussi à obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec l'alcool périllyque, avec plus de 99 % de conversion en utilisant l'acétate de vinyle en 24 h et un rendement légèrement inférieur de 74 % avec l'acide acétique. Notons qu'à 48 h de réaction, le rendement n'avait presque pas évolué, avec 76 %. Nous avons également été ravis de pouvoir vérifier que l'enzyme n'est pas capable d'hydrolyser la lactone, ce qui nous a permis d'obtenir le composé désiré sous forme pure après simple filtration (pour enlever l'enzyme) et évaporation des solvants des donneurs d'acyles. Ces nouveaux composés ont ainsi pu être entièrement caractérisés. Nous avons ensuite voulu étudier l'allongement de la longueur de chaîne greffée, et avons réussi à obtenir des rendements de 100 %, 74 % et 69 % en 48 h en utilisant le propionate de vinyle, l'hexanoate de vinyle et l'octanoate de vinyle comme donneurs d'acyle respectivement. Nous avons également réussi à obtenir de manière intéressante 92 % de rendement en utilisant le chloroacétate de vinyle, ce qui démontre la possibilité d'introduire des groupements plus volumineux tels que des halogènes, lesquels sont souvent intéressants pour leurs propriétés biologiques. Ajoutons que nous avons également testé des donneurs d'acyles aromatiques mais aucun résultat probant n'a pu être obtenu avec ces derniers. Une analyse de *docking* des substrats par bio-informatique a alors été réalisée en partenariat avec la Pr. Catherine Humeau (Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, LRGP) de Nancy pour étudier l'interaction entre ces derniers et l'enzyme. Celle-ci n'a pas permis de confirmer la sélectivité de la lipase pour l'estérification de l'alcool primaire en raison du positionnement de la DHLc dans le site actif, ce qui nous laisse penser que c'est la réactivité intrinsèque

des deux alcools qui suffit à faire la différence, en particulier dans le cas des donneurs d'acyl à courte chaîne. Ces résultats sont assez étonnants compte-tenu de la très grande sélectivité de la réaction enzymatique pour l'alcool primaire, et de la difficulté qu'a rencontré Francesca pour retrouver une sélectivité similaire par voie chimique. Il conviendra donc d'approfondir ces études afin de mieux comprendre les raisons de celle-ci. Enfin, nous avons également pu réaliser des essais d'estérification avec l'acétate de vinyle sur la lactucine, la lactucopicine et la *11β,13*-dihydrolactucopicine et avons là encore pu observer un rendement supérieur à 99 % et une sélectivité totale pour l'alcool primaire, ce qui nous a également permis de caractériser les nouveaux esters correspondants. L'ensemble de ces résultats ont ainsi été récemment publiés sous la forme d'un *preprint* dans *ChemRxiv* au printemps 2023, lequel a été soumis dans *ChemCatChem* cet été.<sup>33</sup>

Je dois également mentionner qu'au cours de sa thèse, Juan a également réalisé plusieurs cascades enzymatiques pour la fonctionnalisation avancée de terpènes. La première a concerné la conversion du myrténol en myrténylamine, lequel peut également être obtenu à partir de plantes. Pour cela il a tenté de coupler une alcool déshydrogénase, chargée d'oxyder le myrténol en myrténal, et une transaminase, réalisant l'amination de ce dernier jusqu'au produit voulu. Cependant si l'étape de transamination a pu être mise au point sans difficulté, nous n'avons pas réussi à faire fonctionner les alcool déshydrogénases en notre possession dans le sens de la production du myrténal, et le couplage des deux réactions n'a pas réellement permis d'améliorer les résultats. Cette réaction a néanmoins pu être réalisée par voie hybride, en remplaçant l'alcool déshydrogénase par des nanoparticules d'or supportées, comme je le détaille par la suite.

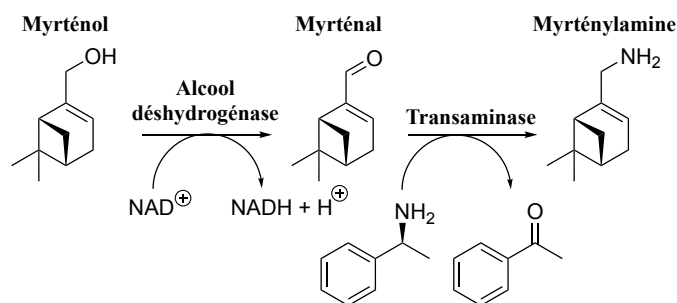


Figure 17 : Concept de synthèse de la myrténylamine à partir du myrténol à l'aide d'une cascade enzymatique faisant intervenir une alcool déshydrogénase et une transaminase.

De la même façon, mais avec plus de succès, Juan a mis à profit sa connaissance des lipases pour proposer, à son initiative, une nouvelle stratégie de synthèse pour des dérivés aminés d'alcools terpéniques. Celle-ci repose sur la synthèse préalable d'un ester arborant un carbonyle, lequel pouvant être alors transaminé. Afin de démontrer son concept, il l'a appliqué sur l'alcool périllyque, en utilisant l'acide pyruvique comme donneur d'acyle (Figure 18). Il a alors réussi à obtenir l'ester avec un rendement proche de 100 % en utilisant la Novozyme 435, et a également obtenu un rendement similaire pour la transamination avec la transaminase Q7NWG4 (acc. num. UniProt) de *Chromobacterium violaceum* lors d'une seconde réaction découplée. Ces résultats prometteurs sont en train d'être reproduits à plus grande échelle afin de pouvoir isoler suffisamment de produit pour pouvoir le caractériser. Nous sommes aussi en train de tester le couplage des deux réactions sous forme biphasique afin de pouvoir faire la synthèse en un seul pot.



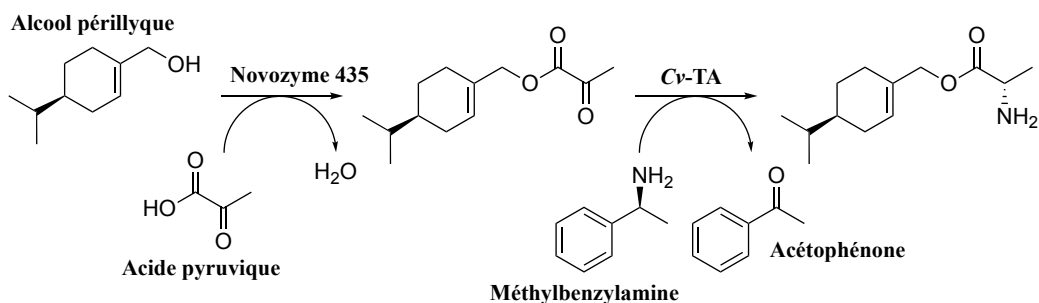


Figure 18 : Stratégie de couplage d'une lipase et d'une transaminase pour la synthèse du *L*-alaninate de ((*S*)-4-isopropylcyclohex-1-en-1-yl)méthyle à partir de l'alcool périllyque, de l'acide pyruvique et d'un donneur d'amine.

Sur la fin de la thèse de Juan, nous nous sommes également intéressés à la fonctionnalisation sans purification préalable de fractions complexes issues de l'extraction aqueuse et organique des composés de la racine de chicoré, comme planifié au début du projet. Pour le moment nous n'avons réussi qu'à tester l'action de la Novozyme 435 sur les différentes fractions fournies par le Dr. Philippe Hance (entreprise Florimond-Deprez). Cependant après analyse en HPLC-MS, plus d'une vingtaine de nouveaux composés ont pu être mis en évidence, lesquels sont encore en cours de caractérisation. De la même façon, l'activité biologique des nouveaux extraits produits sont encore en cours pour voir si les nouveaux composés qu'ils contiennent ont des activités antivirale, antimicrobienne ou cytotoxiques.

**Résumé de ma contribution :** Pour la première étude sur les lipases j'ai été amené à encadrer et aider le Dr. Abdulhadi Aljawish principalement pour la mise en place des stratégies de criblage des enzymes, l'ensemble des expérimentations ayant été faites par lui. Pour la thèse de Juan, j'ai été à l'origine du concept initial du projet, et j'ai également accompagné Juan tout au long de sa formation et de ses expérimentations.

#### **Lien avec mon projet de recherche :**

Outre les connaissances théoriques et pratiques accumulées tout au long de ces études, lesquelles me donnant une solide base d'expérience sur une large gamme de familles d'enzymes, je dispose désormais d'un important panel de biocatalyseurs à ma disposition pour la création de liaisons C-N, C-O et C-C, dont certains sont thermostables (jusque 70 °C), ce qui est intéressant pour la catalyse hybride qui est au cœur de mon projet. Je suis également en train d'ajouter à ce panel la création de liaisons C-X (X = halogène) à travers le projet **PLASTILOOP2.0**, plus particulièrement dans de la partie du projet dédiée à la synthèse de nouveaux monomères polymérisables, pour lequel nous commençons l'études d'halogénases. L'ensemble de ces enzymes sera essentiel à la valorisation de substrats biosourcés, domaine d'application principal de mes recherches, notamment pour la synthèse nouveaux monomères donnant accès à des polymères renouvelables. A titre d'exemple, je compte utiliser les transaminases pour synthétiser de nouveaux monomères aminés, lesquels pourront être polymérisés grâce aux lipases avec des acides organiques issus de l'oxydation de la lignocellulose, ou par polymérisation radicalaire avec de nouveaux aromatiques halogénés, suivant le type de polymère recherché. Cette partie sera réalisée en collaboration avec plusieurs collègues, à commencer par le Pr. Philippe Zinck (UCCS).

Dans le cas où j'aurais besoin d'aller rechercher de nouvelles enzymes dans la biodiversité, je dispose désormais d'une stratégie robuste et d'un partenariat fort avec Véronique De Berardinis pour ce type d'objectif. A ce titre celle-ci sera impliquée au cœur de ma thématique de recherche future, d'une part

dans le cadre de plusieurs projets dont le projet « *DEMO* » (financement *Marie Skłodowska-Curie Actions Doctoral Network*, 2023-2027) que nous venons d'obtenir avec Véronique, et pour lequel nous allons constituer une toute nouvelle banque de méthane monooxygénases solubles pour l'oxydation d'alcane à courtes chaînes. D'autre part, la constitution de nouvelles banques sera essentielle au développement de la catalyse hybride. En effet, il faudra trouver de nouvelles enzymes compatibles avec les catalyseurs chimiques. Ces banques seront également très importantes pour le volet « catalyse digitale » de mon projet. Elles permettent en effet de capturer la diversité structurelle contenue dans UniProt. Celle-ci me servira alors à développer des algorithmes de prédiction des interactions entre une chaîne protéique et un *metal-organic framework*, utiles pour l'élaboration de nouveaux biomatériaux et matériaux hybrides multi-catalytiques, comme nous aurons l'occasion de le voir dans la seconde partie de ce manuscrit.

## ***Axe 2 : Nouvelles stratégies à haut débit pour la valorisation de la biomasse et l'exploitation de souches microbiennes***

Laboratoires :	UMR Transfrontalière BioEcoAgro
Collaborateur·ice·s principaux·ales	Pr. Sébastien Paul (UCCS) Pr. Renato Froidevaux (UMRT BioEcoAgro) Pr. Vincent Phalip (UMRT BioEcoAgro) Dr. François Coutte (UMRT BioEcoAgro) Pr. Stefan Junne (Université Technique de Berlin) Dr. Muriel Billamboz (JUNIA-HEI) Pr. Jean-Sébastien Annicotte (EGID) Pr. Laurent Dubuquoy (INFINITE)
Nombre total de publications :	7 (dont 1 en 1 <sup>er</sup> auteur)
Communications orales :	6 internationales

En janvier 2016, juste après ma soutenance de thèse, j'ai été embauché sur la plateforme REALCAT de Lille. Cette plateforme, gérée administrativement par l'Université de Lille et située dans les murs de Centrale Lille, est dédiée à la synthèse, au test, et à la caractérisation de catalyseurs chimiques et biologiques. Pour cela elle est équipée d'une trentaine d'équipements robotisés à haut débit qui permettent d'accélérer considérablement ces trois phases du développement d'un catalyseur en parallélisant les tests et analyse de ces derniers, avec des *batches* allant de 24 à 384 échantillons.

Outre mes activités de montage et gestion de projet, de conception/réparation mécanique, et de supervision des utilisateur·ice·s de la plateforme, j'ai mené sur REALCAT différentes activités de recherche dont la plupart peuvent être regroupées sous deux catégories principales : la valorisation de biomasses (principalement lignocellulosiques et oléagineuses) et la recherche de nouvelles molécules bioactives biosourcées. Il serait impossible de toutes les détailler ici, étant donné leur éclectisme, ainsi qu'à cause de l'aspect confidentiel de certaines, la moitié d'entre-elles environ ayant été faite à travers des collaborations industrielles. Mais je tâcherai de proposer ici un échantillon représentatif de la variété des approches que nous avons mises en œuvre.

### **Thématique 2.1 : fermentations et tests enzymatiques à haut débit pour la recherche de nouvelles d'enzymes de dégradation de la paroi végétale pour la dépolymérisation de la biomasse lignocellulosique**

L'exploitation de la biomasse comme source de carbone pour l'industrie chimique, avec comme objectif à plus ou moins long terme le remplacement des composés pétrosourcés par des molécules identiques ou alternatives biosourcées et renouvelables, est un des principaux objectifs de la Commission Européenne pour les objectifs de développement durable de 2050. Précisons que l'on entend par « biomasse » la fraction biodégradable des produits, déchets et résidus provenant de l'agriculture (substances végétales et animales), de l'aquaculture, de la sylviculture et des industries connexes (Industries Agro-Alimentaires), la fraction biodégradable collectée séparée des déchets industriels et municipaux ainsi que les boues d'épuration (définition européenne).<sup>34</sup> Il existe de nombreux types de biomasses exploitables au niveau industriel (lignocellulosique, oléagineuse, etc.) représentant une importante diversité moléculaire. Parmi elles, la biomasse lignocellulosique représente la principale source de carbone sur terre avec 140 à 220 milliards de tonnes, soit environ 170 milliards de tonnes de biomasse sèche,<sup>35</sup> et est donc une cible prioritaire. Cependant, son exploitation requière des avancées technologiques importantes et spécifiques pour une

dégradation et valorisation efficace à cause de sa très grande complexité chimique et structurale. La biomasse lignocellulosique, composée principalement par la paroi cellulaire des végétaux, consiste en une intrication dense et non-régulière de plusieurs polymères dont les trois principaux sont la cellulose, la lignine et l'hémicellulose (Figure 19). De plus, ces polymères sont présents en proportions différentes de matière sèche suivant les végétaux mais également selon la période de récolte, la localisation géographique, le procédé de récolte, de prétraitement, d'extraction, etc., ce qui rend chaque biomasse unique face aux méthodes de dégradation. Ceci étant dit, on estime globalement la proportion de cellulose de 35 à 50 %, d'hémicelluloses de 20 à 50 %, et de lignine de 10 à 20 % selon les sources de végétaux d'après la littérature.<sup>36</sup>

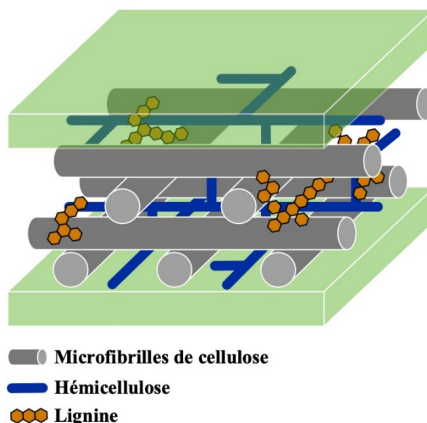


Figure 19 : Schéma simplifié de la composition de la paroi cellulaire des végétaux représentant l'enchevêtrement de la cellulose, de la lignine et de l'hémicellulose

Notons qu'à eux seuls, les trois polymères qui composent la biomasse lignocellulosique regroupent déjà plus d'une douzaine de monomères agencés selon de nombreuses combinaisons différentes par l'intermédiaire de nombreux types de liaisons (c'est à dire glycosidiques pour la cellulose et l'hémicellulose, ou carbone-carbone et éther pour la lignine). Ceci la rend de fait très riche en molécules valorisables, mais également particulièrement complexe à transformer, surtout dans le cadre d'une application précise. La rupture de chacune de ces liaisons nécessite en effet des activités catalytiques variées mais surtout spécifiques. À la complexité intrinsèque à la matière s'ajoute celle des sources d'origine, incluant notamment les produits de l'agriculture (céréales, etc.) et les déchets associés (pailles, rafles, tiges, feuilles, etc.), ou encore les produits et coproduits de l'exploitation forestière comme la pulpe et les écorces de bois, contenant souvent d'autres molécules chimiques exogènes, pouvant parfois jouer le rôle d'inhibiteurs lors des procédés de dépolymérisation. Pour tenter de réussir la dépolymérisation de ce matériaux complexe, de nombreuses stratégies ont déjà été proposées avec plus ou moins de succès, qu'il s'agisse de stratégies mécaniques, physiques, ou chimiques, voir bien souvent combinant plusieurs approches : fractionnement (organosolv,<sup>37</sup> sels fondus,<sup>38,39</sup> etc.), pyrolyse catalytique,<sup>40</sup> dépolymérisation catalytique à basse température,<sup>41-44</sup> etc. Parmi les approches qui semblent à l'heure actuelle les plus prometteuses, celles basées sur l'utilisation de microorganismes et des enzymes de dégradation de la paroi végétale (*cell wall degrading enzymes*, CWDE) qu'ils produisent sont également sûrement les plus durables.<sup>44</sup> Ces approches s'appuient sur l'évolution à laquelle ont été soumis les pathogènes des plantes, pour lesquels la production d'enzyme de dépolymérisation de la lignocellulose est essentielle en vue de pouvoir accéder à leur source de carbone. Ceci fait d'eux des catalyseurs particulièrement optimisés pour les différentes biomasses qu'ils colonisent. Cependant, à l'image de la complexité de la lignocellulose, ces

microorganismes font appel à une batterie d'enzymes particulièrement large et variée (cellulases, hémicellulases et oxydases pour la lignine), les familles et enzymes sécrétées changeant d'un organisme à l'autre et surtout d'une biomasse à l'autre.<sup>45-47</sup> Aussi, plusieurs groupes de recherche travaillent à l'élaboration d'un « cocktail minimum » d'enzymes afin de permettre une dépolymérisation efficace quelle que soit la biomasse.<sup>48-50</sup> Cependant, force est de constater qu'au niveau industriel, les cocktails utilisés ont pour le moment une efficacité limitée, sont souvent mal caractérisés et sont bien souvent non-optimisés pour la biomasse et l'application ciblées.<sup>51</sup> Ceci explique pourquoi de nombreuses études visent aujourd'hui à améliorer ces cocktails, en les complétant avec des activités enzymatiques manquantes, ou en les produisant *de novo*. Notons d'ailleurs que plusieurs études ont décrit l'apparition d'effets de synergie lors de l'ajout de nouvelles enzymes, ou du mélange de plusieurs cocktails, ainsi que d'autres avantages supplémentaires tels qu'une stabilité accrue ou encore un spectre de conditions réactionnelles plus large.<sup>50,52</sup>

Aussi, à partir de ce constat nous avons choisi de commencer à développer sur REALCAT un *workflow* complet permettant de 1) cribler rapidement la capacité de microorganismes à produire les CWDE adaptées à une biomasse donnée, de 2) caractériser les activités enzymatiques sécrétées et évaluer leur efficacité, et d'enfin 3) combiner ces activités sous la forme de « super-cocktails » optimisés pour une biomasse à dépolymériser. L'important était ici de concevoir un *workflow* flexible et rapide pouvant être réitéré pour chaque nouvelle biomasse cible, de manière à répondre rapidement aux variations en composition au niveau industriel. Concernant le type de microorganisme, nous avons ici choisi de nous concentrer sur les champignons filamenteux car ceux-ci sont très largement reconnus pour leur CWDE possédant des activités très variées,<sup>53-55</sup> avec notamment de nombreuses oxydases pour la dégradation de la lignine, activités moins souvent retrouvées chez les bactéries.

### ***Méthodologie de criblage à haut débit de champignons filamenteux en présence de charge réelle de biomasse***

La première étape de ce projet a donc consisté à mettre au point une méthode de production de cocktails enzymatiques fongiques à haut débit, capable de fonctionner avec des champignons filamenteux, utilisant directement les biomasses cibles comme seules sources de carbone. Nous avons en effet supposé qu'il existait une relation étroite entre la composition de la biomasse mise en contact avec les souches fongiques et les familles d'enzymes sécrétées, hypothèse qui a d'ailleurs été formulée dans la littérature.<sup>56</sup> Ceci serait notamment lié à la capacité des souches à détecter dans le milieu environnant des marqueurs moléculaires spécifiques à différentes compositions de biomasse, comme la présence de certains sucres par exemple. Si cette approche devait alors permettre de générer des cocktails déjà en partie optimisés pour chaque biomasse, son principal défaut provient de la forte démultiplication du nombre de conditions de cultures et cocktails à tester afin de pouvoir établir les relations entre les souches, la composition de la biomasse et les activités détectées. C'est pour cela que contrairement aux approches classiques en erlenmeyer, nous avons choisi d'utiliser un BioLector de chez M2p-labs (maintenant Beckmann Coulter), équipement qui est dédié à la réalisation de fermentations en parallèle par groupe de 48 conditions. Cependant cet appareil n'avait jamais été utilisé pour des champignons filamenteux, et encore moins en présence de particules solides de biomasse (Figure 20), choix que nous avons fait afin de nous rapprocher au plus près des conditions de contact naturelles, mais également de celles déployées par la suite au niveau industriel. Après plusieurs tentatives et modifications au niveau du milieu et des conditions de culture, nous avons réussi à atteindre une concentration en déchet végétal de 1 % massique (Figure 21). Cette approche demeure certes loin de conditions de fermentation solide, mais elle est très supérieure aux autres approches à haut débit basées sur

des substrats modèles, et elle permet de comparer les résultats obtenus avec ceux des approches conventionnelles.



Figure 20 : Paille de blé broyée à deux granulométries ( $< 0,25$  mm et  $< 1$  mm) utilisée direction lors des fermentations pour simuler des conditions en milieu submergé, et cibler directement la production d'enzymes efficace contre cette biomasse.

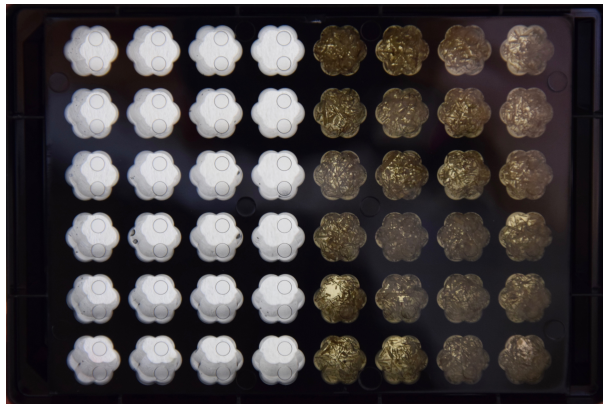


Figure 21 : Vue du dessous d'une plaque de BioLector dans laquelle les puits de droite ont été remplis de milieu minimum supplémentés avec 1 % m/m de paille de blé broyée (1 mm), puis inoculés avec des spores de champignons filamenteux pour une incubation dans le BioLector Pro.

### ***Méthode automatisée à très haut débit pour l'identification de souches bactériennes et fongiques issues de l'environnement***

Partant du principe que les souches les plus optimisées pour la dégradation d'une biomasse donnée sont celles qui la colonisent dans leur environnement naturel, nous avons choisi de ne pas nous appuyer sur la banque de champignons présente à l'UMRT BioEcoAgro, mais plutôt de récolter directement ceux-ci sur les plantes que nous avons utilisées comme source de carbone pour les criblages. L'étape limitante de cette phase de récupération des microorganismes était leur identification. De manière conventionnelle, celle-ci est faite par séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S pour les bactéries, et séquençage des régions ITS pour les champignons. Outre le caractère extrêmement fastidieux et à bas débit de l'étape d'extraction d'ADN requise pour ces analyses, le coût du séquençage ne rend pas cette approche compatible avec du haut débit. C'est pourquoi, en parallèle des essais de mise au point des conditions de fermentation sur champignons modèles, nous avons mis au point une nouvelle approche d'identification des bactéries et des champignons à haut débit reposant sur la technique du *MALDI biotyping*. Celle-ci consiste à extraire les protéines membranaires des bactéries, à les caractériser par spectrométrie de masse MALDI (*Matrix*

*Assisted Laser Desorption Ionization*), puis à comparer le profil en masse avec des bases de données d'organismes déjà identifiés précédemment. Pour les champignons l'approche est similaire à la différence qu'il est possible de travailler soit sur les spores, soit sur le mycélium, avec des résultats différents selon les souches, et même si les spores tendent à donner de meilleurs résultats. Largement utilisée dans le domaine médical, cette approche était déjà utilisée à petite échelle sur REALCAT à mon arrivée. Le point bloquant restant ici le besoin de déposer les échantillons sous la forme de gouttes de 2  $\mu\text{L}$  sur chacun des 384 spots la plaque d'analyse MALDI. Aucune méthode robotisée n'était en effet disponible au niveau commercial pour cette action, limitant cette approche à des laboratoires ayant une main d'œuvre dédiée (hôpitaux), ou à des petites séries d'échantillons. Afin de résoudre ce problème, j'ai conçu, imprimé en 3D puis fait usiner un système d'adaptation de la plaque MALDI sur nos robots de pipetage (Figure 22), et j'ai en parallèle mis au point une nouvelle méthode robotisée capable de fournir le niveau de précision requis pour le dépôt des gouttes sur cette dernière en un minimum de temps, et avec le mélange de solvant aqueux-organique composant la matrice d'analyse MALDI (Figure 23).

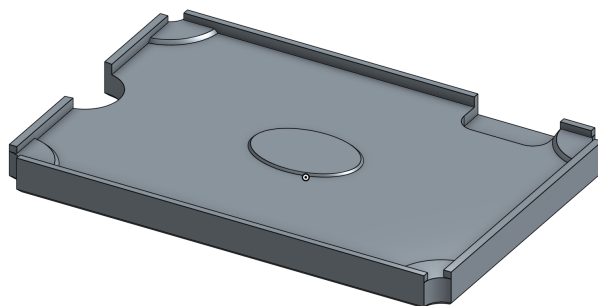


Figure 22 : Représentation 3D de l'adaptateur pour plaque MALDI compatible avec les robots de la marque Beckman Coulter (Biomek NX<sup>P</sup>, FX<sup>P</sup>, i5 et i7) pour le dépôt automatisé d'échantillons.

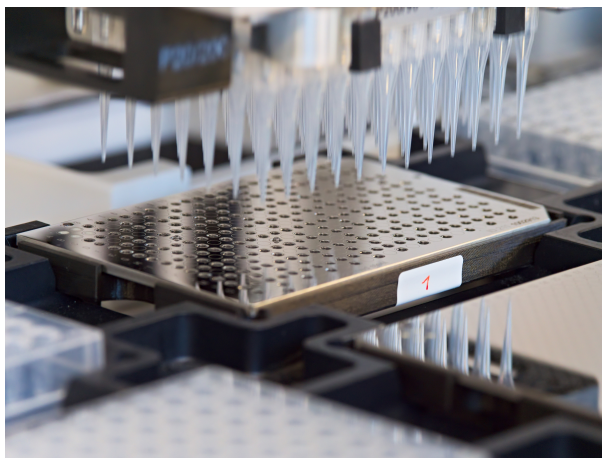


Figure 23 : Photo du dépôt de 384 échantillons de 1,5  $\mu\text{L}$  sur une plaque MALDI à l'aide d'un robot de pipetage Biomek FX<sup>P</sup>.

L'étape limitante de l'opération s'est alors déplacée au niveau du traitement des résultats. Le logiciel fourni par le constructeur du spectromètre MALDI, et chargé de faire la comparaison et le classement des résultats avec les bases de données, est assez sommaire et manque d'options d'analyse poussées et de comparaison. Pour pallier ce problème, j'ai été amené à programmer une interface de retraitement avancée pour la comparaison des spectres entre les échantillons, la visualisation claire des résultats, l'ajout de témoins de vérification de la pertinence des résultats. D'abord programmée en *visual basic for applications*

(VBA), ce programme est en cours d'amélioration et de traduction dans le langage python. Il permet désormais aux utilisateurs d'importer automatiquement les résultats et d'y avoir accès et de les manipuler à l'aide d'une interface web, ce qui accélère et facilite grandement le retraitement.

Au final, cette approche nous a permis de cribler, à travers plusieurs projets, plusieurs centaines de souches microbiennes issues de l'environnement en un temps très restreint. Elle a depuis été reprise et encore optimisée au niveau robot par mon successeur sur REALCAT, le Dr. Quentin Haguët (UMRT BioEcoAgro), et permet actuellement de cribler et identifier 5000 souches de microorganismes par semaine avec réplicat technique. Il s'agit d'ailleurs à l'heure actuelle à notre connaissance de la seule routine robot pour l'analyse MALDI d'échantillon disponible au niveau international, et je l'ai d'ailleurs depuis mise à profit à plusieurs reprises dans le cadre d'autres thématiques de recherche très différentes, comme la dégradation de polymères, ou le milieu du diagnostic médical comme je le détaillerai peu après.

### ***Développement d'un éventail de méthodes analytiques pour la caractérisation des activités enzymatiques de dégradation de la lignocellulose***

Afin de caractériser les activités enzymatiques sécrétées lors des fermentations fongiques, nous avons adapté à haut débit et intégré dans un même flux opérationnel un panel de techniques analytiques complémentaires permettant de mesurer ces dernières et également de détecter et quantifier une partie des produits générés par la dépolymérisation. Pour cela nous avons réuni des techniques ciblant deux catégories d'activités : les activités endo- et exohydrolytiques des polymères de sucres (cellulose et hémicelluloses), et les activités de dépolymérisation plus globales, permettant de mieux appréhender l'activité des cocktails sur le polymère dans son ensemble, et également de quantifier leur action sur la fraction lignine. Pour la première catégorie, nous avons fait appel à des tests chromogéniques classiques basés sur l'utilisation de polymères de sucres modèles fonctionnalisés avec des chromophores. Ainsi, nous avons utilisés l'AZO-cellulose, l'AZO-xylan, l'AZO-barleyglucan, l'AZO-rhamnogalacturonan et l'AZO-casein, pour la détection respective des *endo-1,4-β-D*-glucanase, *endo-1,4-β-D*-xylanase, β-glucanases et *endo*-cellulases, *endo*-rhamnogalacturonan hydrolases, et *endo*-protéases. De la même façon nous avons utilisé le 4-nitrophényl-β-D-glucopyranoside et le 4-nitrophényl-β-D-xylopyranoside pour la détection des activités *exo*-cellulases et *exo*-xylanases respectivement. En complément nous avons tout de même implémenté un test à l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS) pour la détection des activités phénol oxydases (catéchol oxydases, tyrosinases et surtout laccases) et peroxydases, lesquelles étant responsables de la dépolymérisation de la lignine. Pour les activités de dégradation plus globales des cocktails générés nous avons commencé par implémenter les tests, là encore chromogéniques, basés sur la gamme de substrats biomasse développés par la société GlycoSpot®.<sup>57,58</sup> Il en existe deux types : les Chromogenic Biomass Substrates (CBS) et les Insoluble Chromogenic Biomass (ICB). Comme leur nom l'indique, ces substrats s'appuient également sur la fonctionnalisation de substrats avec différents chromophores. Les CBS sont assez proches des substrats AZO- conventionnels, à la différence qu'ils sont fabriqués à partir de polymères naturels issus de véritable biomasse, ce qui permet de se rapprocher un peu plus des conditions réelles de dégradation, et qu'il en existe un très large panel basé sur la biomasse de différents types de plantes, voire même d'animaux (crustacés pour la chitine par exemple). Les ICB sont, quant à eux, non pas composés de polymères spécifiques et « purifiés » à partir d'une source de biomasse, mais directement de la biomasse en elle-même, fonctionnalisée dans la masse. Le procédé mis au point par la société leur permet en effet d'accrocher leurs chromophores jusqu'en profondeur des fibres de biomasse, de manière non-différentielle entre les différents polymères qui la compose. Grâce à ceux-ci, il nous était désormais possible de directement cribler nos cocktails enzymatiques sur du broyat de paille de blé,



d'écorce de pin ou de tout autre type de biomasse. Ceci d'autant plus que la société Glycospot a participé au montage d'un projet H2020 BBI que j'ai coordonné, dans lequel elle avait la charge de nous livrer des substrats fabriqués à partir de nos déchets végétaux. Le projet n'a pas été financé mais nos partenaires ont tout de même fonctionnalisé nos premières sources de biomasse pour faire la preuve de concept. La mise en œuvre de ces tests, bien que plus complexe lorsque robotisée, a donné de bons résultats et nous a permis de mettre au point plusieurs cocktails actifs sur nos biomasses. Pour confirmer l'efficacité des enzymes, ces tests ont été complétés par l'analyse quantitative des sucres libérés lors de la dépolymérisation de biomasse. Pour cela nous avons couplé les fermentations permettant de générer les cocktails avec une seconde étape de saccharification réalisée de manière automatisée à haut débit, puis à l'analyse des sucres générés avec 1) des tests de quantification enzymatique et 2) l'analyse des sucres en HPLC. Là encore, les équipements de REALCAT se sont montrés très adaptés, pour la récupération automatique des surnageant, l'étape de saccharification en plaque, la récupération et préparation des échantillons et l'analyse en HPLC à haut débit de ces derniers. Au final, ce *workflow* complet (Figure 24) permet en une journée de caractériser de manière assez complète les activités des cocktails générés à l'issue des fermentations avec les champignons filamenteux. Celui-ci a fait l'objet d'une publication dans *Microbial Biotechnology*.<sup>59</sup> Il est clair qu'il serait opportun de pousser encore les caractérisations avec d'autres tests enzymatiques par exemple, et surtout en analysant la masse des enzymes présentes dans le mélange pour mieux les identifier. Ceci pourrait être fait par spectrométrie de masse MALDI de la même manière que pour les protéines des souches microbiennes. Pour cela il faudrait réaliser la digestion trypsique de ces dernières, méthodologie développée au sein de l'UMRT BioEcoAgro, à l'aide de REALCAT, mais qui requiert des bases de données spécifiques pour ce type de protéines que nous ne possédons pas encore.

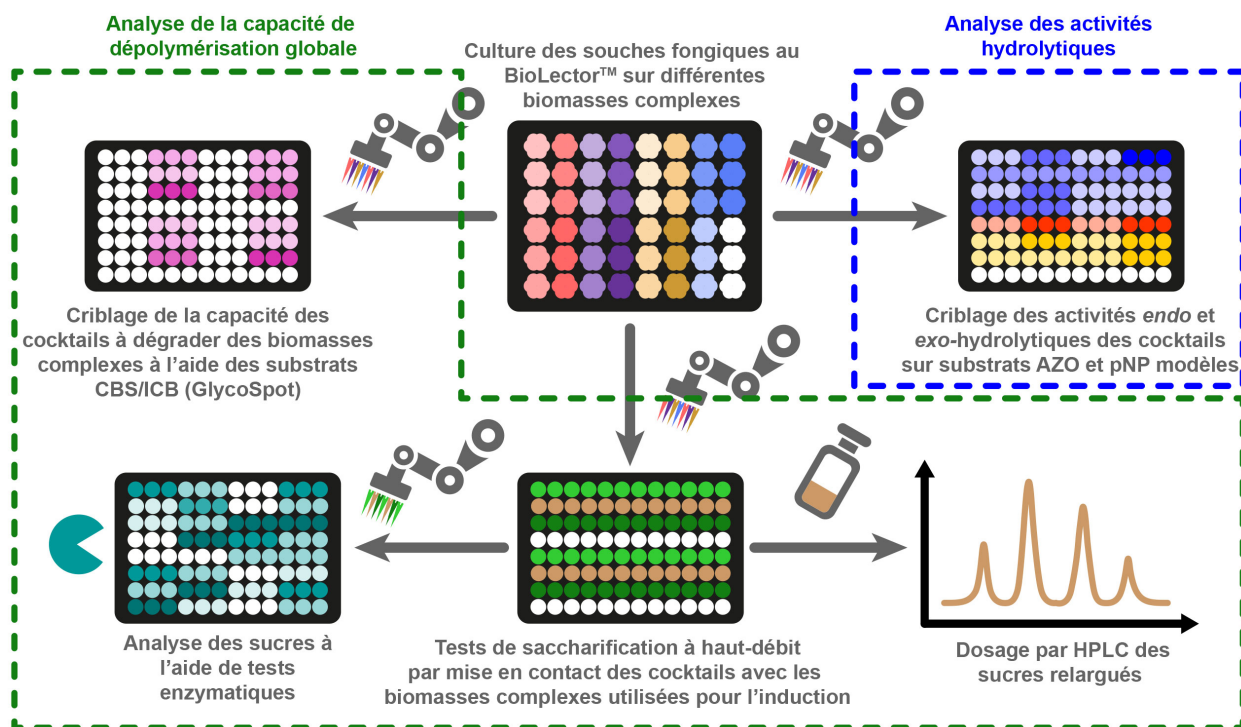


Figure 24 : Approche automatisée faisant appel à un panel de techniques analytiques complémentaires pour la caractérisation à la fois des activités enzymatiques présentes dans les cocktails enzymatiques, et de la capacité de ces derniers à dépolymériser de manière globale la biomasse lignocellulosique.

Depuis, ce panel de techniques a été complété avec une méthode de quantification des acides organiques à courte chaîne (acide acétique, butyrique, pyruvique, succinique et lactique). Ceux-ci peuvent en effet être générés lors de la fermentation sombre bactérienne des sucres issus de la lignocellulose et ils étaient la cible de notre projet européen FACCE-Surplus « *PASS-BIO* », coordonné par le Pr. Stefan Junne (Université Technique de Berlin, Allemagne). Ce projet visait ainsi au développement d'un nouveau type de réacteur à piston court pour la valorisation de déchets végétaux à l'échelle de communautés locales (Figure 25). Ce dernier a pour objectif de se poser en opposition aux réacteurs à pistons utilisés de manière traditionnelle dans les exploitations agricoles, dont les temps de séjour sont de plusieurs mois, et qui nécessitent une alimentation en biomasse très élevée et si possible constante en composition. Notre nouveau réacteur devant être au contraire très versatile, nous avons profité de notre nouvelle stratégie pour mettre au point des cocktails capables de prétraiter les biomasses ciblées pour en libérer les sucres et les rendre plus accessibles aux bactéries. Les résultats de la sélection de ces nouveaux cocktails et de leur implémentation font l'objet d'une troisième publication qui est en cours de finalisation.



Figure 25 : Exemple de réacteur à piston de faible dimension pour une implantation auprès de petites collectivités.  
(Photo par Stefan Junne)

***Combinaison rationnelle automatisée de cocktails enzymatique pour l'optimisation de leur capacité catalytique.***

La dernière étape de ce projet, qui est encore en cours, consiste à créer des « super cocktails » à partir de plusieurs cocktails enzymatiques complémentaires provenant des fermentations précédentes pour accentuer leur potentiel de dégradation, ou orienter cette dernière vers la production de certains composés. Une fois encore nous avons choisi de nous appuyer sur une approche à haut débit, pour réaliser la combinaison des cocktails enzymatiques de manière systématique dans un premier temps, puis de manière rationnelle par la suite (Figure 26).

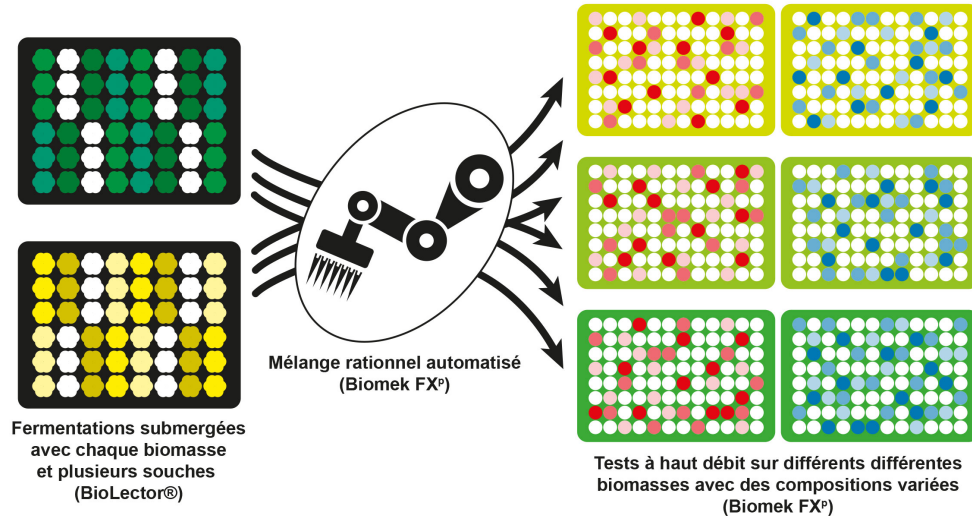


Figure 26 : Stratégie globale de combinaisons de cocktails enzymatiques générés à partir d'un criblage de souches fongiques sur différentes biomasses, pour l'évaluation à haut débit des meilleurs mélanges.

Pour cela il m'a fallu programmer une interface capable de générer automatiquement les plans de plaques à partir des paramètres des combinaisons à réaliser (pourcentage en chaque cocktail, volume total, dilutions préalables à effectuer, etc.) et qui soit compréhensible par une machine (en l'occurrence nos robots de pipetage). Celle-ci nous a alors permis de commencer à combiner les surnageants de fermentation, et les premiers résultats effectués sur paille de blé et épines de pin ont effectivement montré la présence d'effets de complémentarité entre les cocktails (Figure 27). Mais plus encore, ils ont également permis de mettre en évidence le fait que le type de biomasse sur laquelle les champignons sont mis en croissance, et par extension la composition de cette dernière, joue un rôle prédominant dans le type d'activité enzymatique générée.

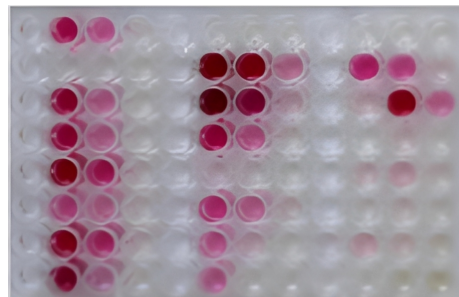


Figure 27 : Photo d'une plaque de criblage obtenue après 24h d'incubation en présence de mélanges de 3 surnageants de culture fongique en différentes proportions suivant le puits. Le niveau de coloration corrèle la capacité du nouveau cocktail enzymatique à dégrader la biomasse utilisée pour la production du substrat ICB utilisé lors du test (paille de blé).

Ceci tend à confirmer notre hypothèse initiale à propos de la présence de marqueurs moléculaires intrinsèques à chaque biomasse dictant la sécrétion de certaines familles d'enzymes plutôt que d'autres. Ces premiers résultats sont donc prometteurs pour une poursuite dans cette voie d'étude, et ils ont récemment été publiés dans *Biotechnology Letters*.<sup>60</sup> Dans un futur proche, ce projet va être poursuivi dans le cadre du financement par l'ANR de notre PRC « PEECFUEL », au sein duquel la production de nouveaux cocktail à l'aide de combinaisons étendues va être menée pour la génération sélective de glucose

et xylose. Ceux-ci serviront de substrats de départ pour la génération de petites molécules plateformes par électrocatalyse assistée par résonance plasmonique, réalisée par le Pr. Rabah Boukherroub (Institut d'Électronique de Microélectronique et de Nanotechnologie, IEMN) et coordinateur du projet. Ces travaux font d'ailleurs suite à une première étude sur l'oxydation du méthanol en CO<sub>2</sub> utilisant une approche similaire et qui a donné lieu à une publication dans *ACS Applied Materials & Interfaces*.<sup>61</sup> Afin de pousser plus loin le concept, et d'encore accélérer l'optimisation des cocktails, je compte faire appel à des algorithmes en apprentissage machine (*machine learning*) pour la prédiction des combinaisons à réaliser comme cocktails. Compte-tenu du caractère multi-dimensionnel du problème, mais également du faible nombre de données générées (quelques centaines tout au plus), je pense plutôt m'orienter sur une méthode de prédiction basée sur de l'optimisation bayésienne de type *gaussian process*.<sup>62,63</sup> Ce type d'algorithme est en cours d'implémentation dans le cadre d'une thèse coordonnée par le Pr. Sébastien Paul (UCCS) sur la partie chimie de REALCAT. Elle a pour objectif d'optimiser les conditions réactionnelles d'une réaction catalytique modèle en prédisant le set de paramètres (température, pression, débit, concentration en réactif, etc.) à appliquer à chaque nouveau cycle de test sur le réacteur en flux utilisé afin de tendre vers le meilleur rendement en un minimum de cycles. Dans mon cas, je compte faire travailler l'algorithme à la prédiction des proportions optimales pour chaque surnageant enzymatique d'un set donné, en optimisant le vecteur formé par les concentrations en glucose et en xylose, soit en faveur de la production de l'un de manière majoritaire, soit en maximisant la concentration totale en sucres. Dans un second temps je m'intéresserai également à ajouter au vecteur la concentration en autres sucres et molécules organiques non-souhaitées, avec cette fois pour objectif la minimisation de ces dernières.

**Résumé de ma contribution :** Pour ce projet, qui a démarré avec le financement CockEnzStoc, j'ai été chargé d'accompagner et de superviser la Dr. Roxane Raulo, chercheuse Post-Doctorante, pour la mise en œuvre des stratégies et tests de criblages, mais également pour le développement des méthodes analytiques. Suite à ce premier projet, j'ai été responsable pour la partie lilloise du montage du projet *PASS-BIO* (H2020 FACCE-Surplus), avec le Pr. Stefan Junne et l'entreprise Luke en Finlande. L'obtention du financement nous a permis de poursuivre le contrat de Roxane Raulo, que j'ai continué d'encadrer dans le cadre de ce projet. En parallèle, j'ai également personnellement conçu et réalisé l'adaptateur 3D qui permet le dépôt automatisé des échantillons sur plaque MALDI, ainsi que la programmation des robots pour ce dépôt ou pour le mélange rationnel des cocktails enzymatiques fongiques. Toujours en programmation, j'ai également réalisé le module permettant de convertir les plans d'expérience et de plaques pour le mélange des cocktails en instruction compréhensibles par les robots de pipetage. J'ai également été impliqué dans de nombreuses actions de dissémination et de vulgarisation à cette occasion, et ai été à l'origine de la mise en œuvre d'un premier panel de citoyen pour l'étude de l'acceptabilité de notre recherche par la société, en partenariat avec la Dr. Martine Legris (Centre d'Études et de Recherches Administratives, Politiques et Sociales, CERAPS).

## **Thématique 2.2 : stratégies de criblage à haut débit de fermentations pour la production de molécules bioactives**

Une part importante des projets de recherche menés au sein de l'Institut Charles Viollette (ICV), aujourd'hui devenu l'UMRT BioEcoAgro, concerne la recherche de nouvelles molécules à activité biologique. Ceux-ci s'inscrivent en particulier dans le domaine de la nutrition ou du biocontrôle. En tant qu'ingénieur REALCAT j'ai été amené à prendre part de manière active à plusieurs de ces projets, pour

lesquels j'ai plus particulièrement été sollicité pour mes compétences en développement de tests biochimiques à haut débit.

### ***Production de nouvelles molécules antimicrobiennes provenant de cocultures mettant en œuvre des couples bactérie+champignon, pour une application en biocontrôle***

Selon une récente étude, il est possible d'estimer les pertes de récoltes dues aux maladies des plantes comme s'élevant à 25 % de la production agricole mondiale par an.<sup>64</sup> En conséquence, la gestion des maladies des plantes est un élément de coût important dans l'agriculture. Traditionnellement, les approches pour la lutte contre les maladies dans les écosystèmes agricoles comprennent la sélection de variétés résistantes des espèces cultivées, l'amélioration des procédures d'hygiène pour empêcher la propagation de pathogènes provenant de sols ou de semences contaminés, et les phytopathogènes pour tuer les souches potentiellement infectieuses de champignons et de bactéries.<sup>65</sup> Toutefois, les inquiétudes croissantes concernant les effets des phytosanitaires sur l'environnement et les résidus dans les aliments ont entraîné la suppression de l'homologation d'un certain nombre de fongicides.<sup>66</sup> La nécessité de les remplacer a accru l'intérêt pour la lutte biologique contre les maladies des plantes au cours des dernières années. Celle-ci, plus couramment appelée « biocontrôle » consiste en l'application d'agents biologiques, ou les molécules qu'ils produisent, sur un animal ou une plante hôte, lesquels qui empêchant le développement de l'agent pathogène concerné. En ce qui concerne les maladies des plantes, les agents de lutte biologique sont généralement des souches bactériennes ou fongiques isolées de l'endosphère ou de la rhizosphère.<sup>65</sup> Les virus peuvent également être utilisés comme agents de biocontrôle et il existe un regain d'intérêt pour l'utilisation de virus bactériens dans la lutte contre les maladies des plantes.

Parmi les pathogènes qui font actuellement la cible des recherches en biocontrôle, les pathogènes cryptogamiques touchent plusieurs espèces de plantes et peuvent, en plus de provoquer une perte de rendement, entraîner une diminution de la qualité organoleptique des cultures, voire même affecter la santé des consommateurs en raison de la production de mycotoxines.<sup>67</sup> Ces maladies comprennent le genre de champignons *Fusarium* qui est composé de nombreuses espèces. Les exemples les plus connus sont *Fusarium graminearum*, principal agent de la fusariose du blé et producteur de mycotoxines telles que le deoxynivalenol,<sup>68</sup> et *Fusarium oxysporum*, dont les souches peuvent cibler un large éventail de plantes cultivées telles que les cultures de lin<sup>69</sup> ou les fruits, comme la pastèque<sup>70</sup> ou la banane<sup>71</sup> et représentent des pertes considérables. Les solutions existantes pour limiter les effets ou éradiquer les maladies cryptogamiques causées par *Fusarium* restent limitées, surtout dans le sillage des restrictions croissantes à l'égard des produits phytosanitaires. Par conséquent, les molécules issues directement de l'environnement, compatibles avec du biocontrôle suscitent un intérêt croissant, même si actuellement, seuls trois de ces produits sont autorisés en France pour une utilisation contre ce pathogène. Il en va d'ailleurs de même pour la quasi-totalité des phytopathogènes, pour lesquelles les solutions de biocontrôle "correspondantes" sont généralement rares.<sup>65</sup>

A l'inverse, de nombreuses espèces de microorganismes ont pourtant déjà montré une activité contre les champignons pathogènes des plantes, comme certaines bactéries appartenant au genre *Bacillus* ou *Pseudomonas*, connues pour leur production de lipopeptides,<sup>72,73</sup> *Streptomyces*, qui produit des antibiotiques parmi d'autres métabolites secondaires intéressants,<sup>74</sup> ou *Trichoderma*, un champignon qui est également un mycoparasite.<sup>75</sup> Néanmoins, leur utilisation pour du biocontrôle restent limitées 1) par le fait que les interactions observées dans la nature impliquent souvent plus d'un participant et plus d'une molécule active,<sup>65</sup> et 2) par la difficulté de synthétiser les certaines molécules responsables de ces dernières dans des conditions de laboratoire. Ceci est particulièrement documenté pour les microorganismes qui ont des

génomés bien connus et pour lesquels il est possible de prédire *in silico* la production de certains métabolites secondaires qui n'ont pourtant jamais pu être retrouvé *in vitro*.<sup>76</sup> Parvenir à éliciter l'activation des gènes silencieux impliqués dans la production de ces molécules chez les microorganismes concernés représente donc une étape cruciale pour leur utilisation future en biocontrôle. Un des moyens d'arriver à cette fin pourrait consister à faire croître la souche productrice en présence du pathogène qu'elle cible, en s'appuyant sur l'hypothèse que les microorganismes ne produisent leurs molécules de défense et de lutte que lorsqu'ils sont en présence des marqueurs moléculaires adéquat provenant des espèces à combattre, notamment lors de cocultures.<sup>77</sup> Ce principe est d'ailleurs similaire à celui sur lequel nous nous sommes précédemment basés pour la production des cocktails d'enzymes optimisés pour une source de biomasse donnée.

Ce faisant, à travers la thèse d'Eléonore Méphane, menée en partenariat avec l'équipe du Pr. Michel Lopez (Unité de Recherche et de Développement Agro-Biotechnologies Industrielles, URD ABI), ainsi qu'avec l'entreprise Soufflet, nous avons cherché à éprouver cette hypothèse pour tenter de produire de nouveaux antifongiques actifs contre *F. oxysporum*. Pour cela nous avons proposé une approche globale (Figure 28) basée sur la réalisation de cocultures bactéries+champignons en Biolector®, permettant de cribler un nombre important de couples, associée avec des tests antifongiques, réalisés sur *F. oxysporum* et *S. cerevisiae* pour sélectionner les plus efficaces vis-à-vis de leur inhibition. Ceux-ci devant alors être transposés à plus haute échelle pour une production suffisante de surnageant pour pouvoir réaliser un fractionnement afin d'identifier les différentes molécules présentes en mélange. Pour finir, cette identification est couplée avec la détermination des activités antifongiques de chaque fraction afin de déterminer les activités de chaque molécule, mais également et surtout, de voir si celles-ci demeurent actives une fois séparées. En effet, il a été décrit à plusieurs reprises que l'activité d'un extrait pouvait provenir d'un effet de synergie entre les molécules du mélange, orientant alors sur le type de conditionnement des extraits à développer par la suite. Cette stratégie a été proposée dans le cadre du projet CO4 (COcktails, BioCOntrol, CO-cultivation, COntrolled release), dont la thèse d'Eléonore était le point de départ.

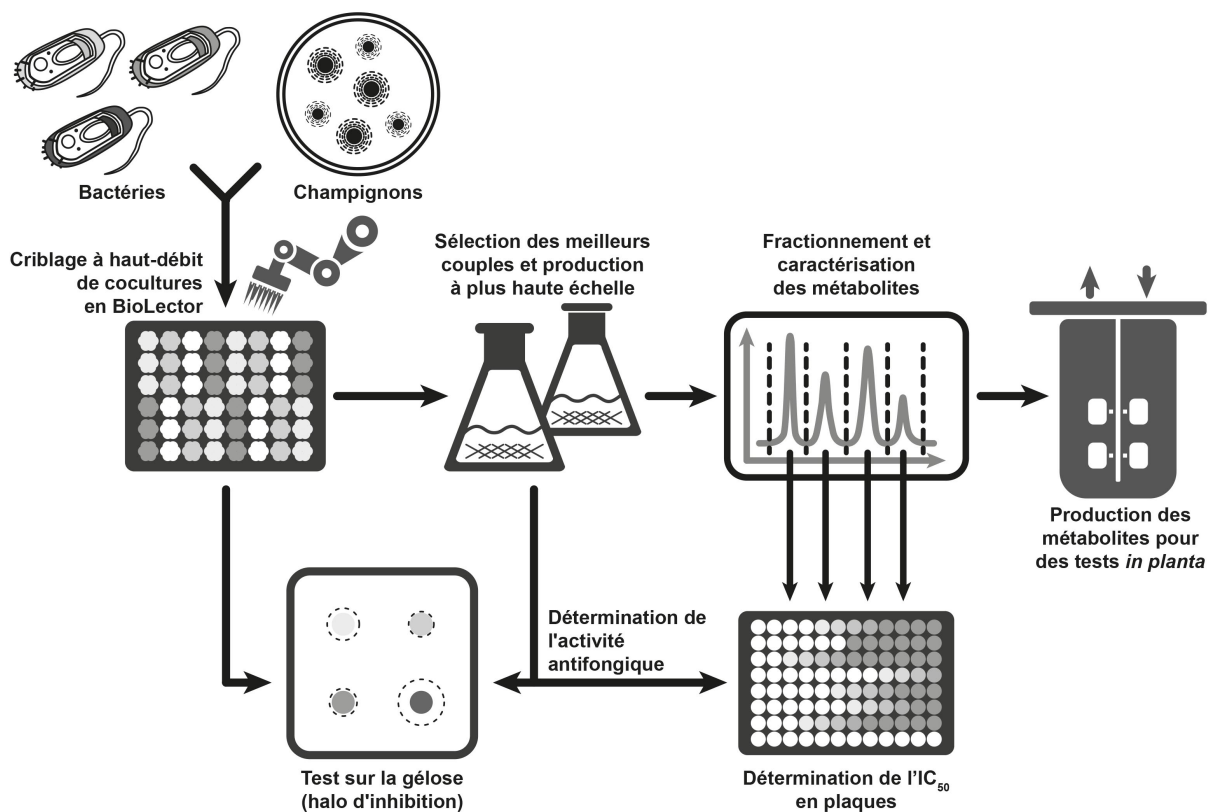


Figure 28 : Stratégie de mise en œuvre de cocultures bactéries+champignons pour la production et l'identification de nouveaux antifongiques.

Pour notre étude nous avons donc commencé par sélectionner les couples à cribler. Nous avons en tout choisi 5 souches de bactéries et 5 souches de champignons, conduisant au criblage de 10 monocultures (conditions témoins) et de 25 cocultures. La sélection de ces souches a été réalisée en accord avec la littérature, le but étant d'essayer d'observer à la fois des effets antagonistes et agonistes chez des couples formés. Si nous nous attendions raisonnablement à pouvoir observer le premier type d'effet, les bactéries cherchant à se défendre contre le champignon mis en présence, nous étions en effet curieux de voir si l'inverse ne pouvait pas également se produire, avec une coopération des deux organismes entraînant la production de métabolites jusque-là inconnus. Le choix s'est donc porté sur des espèces à la fois bien connues pour leurs activités antifongiques (les bactéries *Bacillus subtilis* et *Streptomyces coelicolor* et le champignon *Trichoderma harzianum*), ou appartenant à des genres bien étudiés pour leurs métabolites secondaires d'intérêt (les bactéries *Pseudomonas syringae*, *Streptomyces sp.*, *Dietzia sp.* et les champignons *Aspergillus oryzae*, *Pseudozyma aphidis*, *Cladosporium cladosporioides*, ainsi que l'agent pathogène cible, *Fusarium oxysporum*). Nous avons également choisi de faire conduire les fermentations dans 3 milieux de culture différents, le NB (*Nutrient Broth*) et LB (*Luria-Bertini*) en milieux riches, et le milieu minimum GMM (*Gut Microbiota Medium*) pour induire un stress lors de la croissance. Forts de notre précédente utilisation du BioLector pour la production de cocktails enzymatiques fongiques, nous avons ensuite mis en œuvre les fermentations dans ce dernier. De manière intéressante, et même si les courbes présentent tout de même un bruit important (Figure 29), il a été possible d'observer, et d'une certaine façon quantifier, la croissance des deux types de microorganismes alors que nous craignons de ne pas pouvoir détecter celle des champignons à l'aide du système de mesure par diffusion de lumière de l'appareil. Notons que l'allure des courbes était très dépendante du type de croissance du champignon (filamenteuse sous forme de pelotes,

forme planctonique, etc.) (Figure 30). Ceci est particulièrement intéressant pour le détournement de l'utilisation du BioLector vers la réalisation de réaction en catalyse hétérogène (notamment hybride) comme nous aurons l'occasion de le voir par la suite.

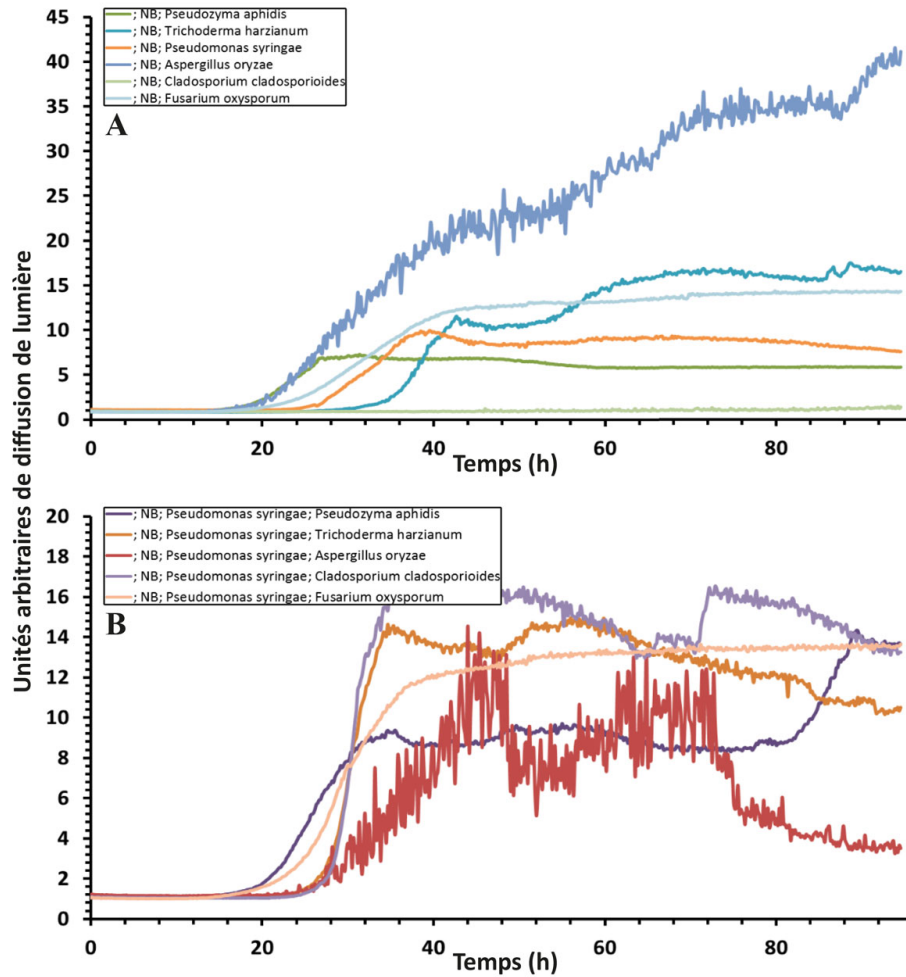


Figure 29 : Courbes obtenues pour les monocultures (A) de 6 bactéries et champignons dans le milieu NB, et pour les cocultures (B) dans du NB impliquant *Pseudomonas syringae* et les 5 champignons criblés.

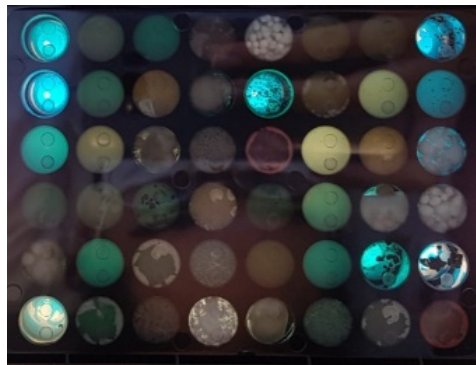


Figure 30 : Vue du dessous d'une des plaques de BioLector obtenue après 100 h de fermentation (monoculture ou coculture) montrant la diversité des morphologies de croissance des souches bactériennes et fongiques.



En résultat, nous avons pu observer de bonnes croissances pour toutes nos souches dans les 2 milieux riches. Pour le GMM, comme nous le craignons certaines souches n'ont pas poussé. Ajoutons que les triplicats expérimentaux se sont également montrés répétables, prouvant à nouveau l'efficacité du BioLector pour ce type de criblage. De manière intéressante, nous avons déjà pu observer des différences entre les monocultures et les cocultures avec 1) le changement de morphologie des champignons notamment, en présence ou absence des bactéries, et 2) avec l'apparition de pigments colorés dans le cas de certaines cocultures. Au total, d'un point de vue visuel, dans les milieux riches (LB et NB), 22 cocultures sur 25 ont montré un développement différent de la monoculture, alors que c'était le cas de 9 cocultures sur les 10 dans le milieu GMM. En résumé, 88,3 % des cocultures ont montré un développement différent des monocultures.

Comme prévu, les surnageants ont ensuite été testés pour leurs activités antifongiques sur *F. oxysporum* et *S. cerevisiae* en milieu gélosé. Sur les 25 cocultures testées, 13 ont montré une activité antifongique mesurée par des diamètres d'inhibition détectables à l'œil nu (Figure 31). Sur ces 13 cocultures, 3 ont montré une activité sur différents milieux dans les conditions choisies contre *S. cerevisiae*. Contre *F. oxysporum*, seul un couple a été détecté comme produisant un surnageant actif. De manière prometteuse, ce surnageant a également été trouvé comme actif contre *S. cerevisiae*. Je précise que les couples impliqués ne sont pas mentionnés ici car ils font l'objet d'un dépôt de brevet, encore en cours. Il est également intéressant de noter que si certaines cocultures n'étaient pas observables par le suivi de la croissance des microorganismes en BioLector, elles ont tout de même montré une augmentation de l'activité antifongique de leur surnageants par rapport à ceux des monocultures correspondantes.

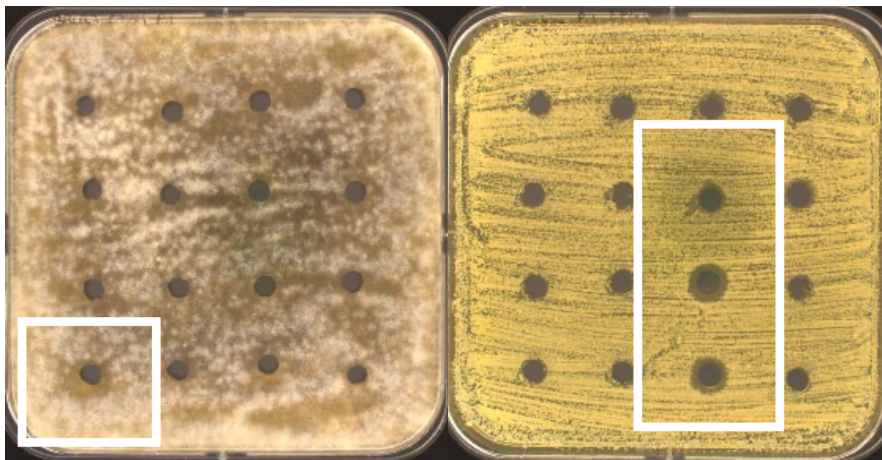


Figure 31 : Exemple de test d'inhibition des surnageants issus des cocultures en BioLector contre *F. oxysporum* (à gauche) et *S. cerevisiae*, sur milieu gélosé. Les surnageants actifs sont entourés par un rectangle blanc.

De manière intéressante, nous avons également pu observer à l'issue de ces tests que le milieu LB était celui qui semblait promouvoir au mieux la production de métabolites antifongiques. Une tentative de concentration des surnageants, afin d'accentuer leur action inhibitrice et de pouvoir mesurer précisément les halos, a été menée. Elle n'a cependant pas été concluante compte-tenu du faible volume de surnageant obtenu lors des criblages en BioLector. Les 5 couples cités précédemment ont alors été à nouveau cultivés en coculture, cette fois à plus haut volume en erlenmeyers. Les surnageants générés ont alors été concentrés jusque 20 fois, et ont à nouveau été testés. Comme espéré, nous avons pu observer des halos d'inhibition beaucoup plus importants, que nous avons cette fois pu mesurer, avec un diamètre dépassant les 30 mm pour les plus importants (Figure 32).

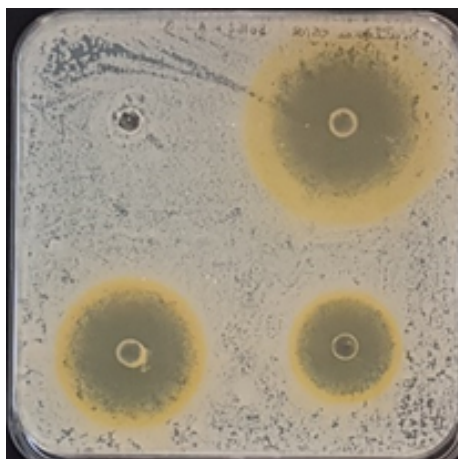


Figure 32 : Exemple d'halos d'inhibition obtenus contre *S. cerevisiae* après concentration par 20 des surnageants produits à partir des cocultures en erlenmeyers.

En conclusion, nous avons pu confirmer l'action des surnageants issus des couples précédemment sélectionnés. Nous avons ainsi pu observer non seulement un effet additif dans le cas de souches déjà connues pour leur capacité à produire des métabolites antifongiques, mais également dans certains cas l'effet synergique que nous recherchions, l'activité du surnageant généré en coculture étant supérieure à la somme de celle des deux monocultures. Ceci valide notre approche de criblage en deux phase, laquelle sera prochainement étendue à de nouveaux couples.

Afin de commencer à étudier plus en détail l'action des surnageants obtenus à partir des couples les plus efficaces, nous avons sur la fin du projet commencé à réaliser l'analyse de la composition de ces derniers par chromatographie en phase liquide à haut pression assistée par spectrométrie de masse (HPLC-MS). Il est évidemment illusoire d'imaginer pouvoir détecter chaque métabolite présent, notamment à cause des effets de masquage par ionisation différentielle en masse, ou simplement parce que la concentration de certaines molécules est trop faible. En revanche, en utilisant les méthodes d'analyse de métabolites déjà développées au sein de l'UMRT BioEcoAgro, et en croisant les résultats avec les bases de données de spectres de masse en notre possession, nous avons pu identifier près d'une cinquantaine de molécules pour chaque couple, appartenant à différentes familles (ions, acides carboxyliques et lactones, amines et amides, peptides et dérivés d'acides aminés, alcools et sucres, etc.). Parmi elles, une part importante n'a pu être complètement identifiée et il conviendra de croiser les techniques analytiques pour tenter d'élucider leur structure. Cela dit, qu'elles aient été identifiées ou non, nous avons été agréablement surpris de constater que près de la moitié d'entre elles n'ont été détectées que dans le cas de la coculture, ce qui corrobore les résultats que nous avons précédemment obtenus, ainsi que notre hypothèse de départ. Parmi les molécules que nous avons pu identifier uniquement dans les cocultures, et qui ont des activités antifongiques reconnues, on pourra citer l'auxine, qui possède des propriétés antimicrobiennes en plus de propriétés de promotion de croissance des plantes, la desferrioxamine E, un antifongique récemment découvert pouvant entrer en compétition avec les systèmes de captation du fer,<sup>78</sup> ou la bénarthine, qui a été décrite pour ses propriétés également antimicrobiennes.<sup>79</sup>

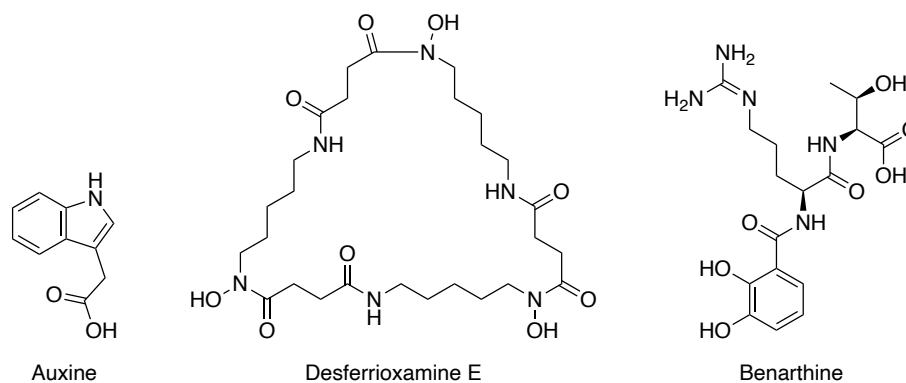


Figure 33 : Structures de l'auxine, de la desferrioxamine E et de la benarthine.

Je terminerai en précisant que ces analyses sont toujours en cours, et que leur développement plus poussé fera l'objet d'un prochain projet qui devrait démarrer en 2024. Celui-ci s'intéressera également à tester les surnageants les plus actifs *in planta*, à la fois sous croissance contrôlée en serre, mais également en champ, grâce à l'aide de la société InVivo, qui a récemment fait l'acquisition de Soufflet. L'ensemble des résultats obtenus jusqu'ici feront également l'objet d'une publication une fois le brevet déposé.

### ***Production et criblage de lipopeptides pour leurs propriétés bio-surfactantes et antimicrobiennes.***

Les lipopeptides sont des métabolites secondaires produits par certaines souches bactériennes et fongiques. Comme leur nom l'indique, il s'agit de peptides, cycliques ou non, portant une chaîne grasse hydrophobe sur l'une des chaînes latérales des aminoacides ou au niveau d'un des groupements terminaux libres. L'importance de ces composés réside en conséquence dans leurs capacités biosurfactantes, le couplage de ces deux types de groupements chimiques leur conférant d'importantes propriétés tensioactives. Ceci rend ces molécules particulièrement intéressantes pour des applications en bioremédiation environnementale,<sup>80,81</sup> leurs activités antimicrobiennes,<sup>82-84</sup> et leur action synergique avec d'autres métabolites secondaires.<sup>85</sup> Un axe de recherche de l'UMRT BioEcoAgro concerne la production de ce type de molécules et sur leur utilisation dans le cadre du biocontrôle que nous avons vu précédemment. L'une des familles de lipopeptides les plus étudiées et les plus actives de manière générale sont les surfactines, des heptapeptides dotés d'une forte activité de surface.<sup>86-88</sup> Cette famille de lipopeptides était déjà particulièrement étudiée au laboratoire avant mon arrivée et la mise au point de nouvelles méthodes de production et purification à partir de souches de *Bacillus* a d'ailleurs conduit au montage de la start-up Lipofabrik en 2012. D'autres familles de lipopeptides sont également produites par les souches de *Bacillus* étudiées au laboratoire, notamment les iturines (iturine A, mycosubtiline et bacillomycine) et les fengycines (fengycine A et B, plipastatine). Leur activité antifongique les rend tout particulièrement intéressantes dans le cadre du biocontrôle, pour lutter contre les maladies des cultures causées par des champignons filamenteux. Aussi, parvenir à augmenter la capacité de production de lipopeptides de ces souches, ou trouver de nouvelles souches productrices plus efficaces, sont deux axes de recherche essentiels dans l'objectif du remplacement des phytosanitaires conventionnels, lesquels sont de plus en plus décriés pour l'importante pollution qu'ils engendrent. Quelle que soit l'option choisie, la mise au point de méthodes de détection et quantification efficaces et rapides des lipopeptides apparaît comme une condition *sine qua non*, surtout dans le cadre de l'ingénierie métabolique de souches ou de l'exploration de la biodiversité. De manière conventionnelle les lipopeptides sont quantifiés, souvent difficilement, par HPLC-MS. Ceci nécessite au préalable une calibration délicate ainsi qu'une étape de nettoyage par extraction en phase solide ce qui rend la méthode peu compatible avec du haut débit.<sup>89</sup> Peu avant le démarrage de notre projet, une

procédure colorimétrique de dosage de la surfactine avait été publiée. La méthode utilise le colorant anionique bleu de bromotimol (BTB) comme indicateur et le cetylpyridinium chloride (CPC) un surfactant cationique comme médiateur.<sup>90</sup> En absence de lipopeptide, les deux réactifs forment un complexe, ce qui éteint la coloration du BTB. En présence de surfactine, un équilibre de complexation s'établit entre le CPC et cette dernière, libérant progressivement le BTB avec l'apparition de la coloration. Cependant, le complexe entre le CPC et le BTB n'est pas stable et a tendance à très rapidement précipiter, et la limite de détection du test, égale à 0,1 g/L, le limite à des souches déjà en mesure de produire des quantités importantes de lipopeptide. Cela peut ne pas s'avérer limitant pour l'optimisation de la production de surfactine pour lesquelles la communauté scientifique possède déjà plusieurs souches efficaces, mais pour les autres familles de lipopeptides comme les fengycine et iturines, souvent produites en plus faible concentration, il nous a paru important d'améliorer cette méthode afin de la rendre plus sensible. Aussi, nous avons opté pour une approche fluorimétrique, en remplaçant le BTB par de l'uranine (fluorescéine) qui a un comportement similaire en présence du CPC et qui a la faculté de fluorescer ( $\lambda_{\text{ex}} = 482 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ ). Après optimisation de la concentration des différents composants du test, nous avons réussi à obtenir une excellente linéarité pour les courbes de calibration en surfactine, fengycine et mycosubtiline, associée à une excellente limite de détection de  $1.5 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$  en surfactine dans l'eau, soit près d'un facteur 10 inférieur au test de la littérature. Afin de pouvoir envisager son utilisation directe pour le criblage des surnageants de culture, nous avons également réalisé les courbes de calibration dans deux milieux de culture : le milieu de Luria-Bertini (LB), comme milieu de référence, et le milieu de Landy modifié, lequel ayant été optimisé spécifiquement pour l'induction de la production de lipopeptides chez *Bacillus subtilis*. Si la LOD (*Limit Of Detection*) calculée pour la surfactine dans le LB s'est retrouvée près de 4 fois supérieure à celle calculée dans l'eau ( $4.4 \times 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ ,  $r^2 = 0.9838$ ), celle déterminée dans le Landy a été trouvée comme 2 fois inférieure ( $8.0 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ ,  $r^2 = 0.9988$ ). Nous avons supposé que cette différence venait de la présence d'une concentration importante en peptides dans le LB, ce dernier étant un milieu assez riche, lesquels pouvant interférer avec le CPC à la place des lipopeptides. Ces résultats ont ensuite été confirmés par HPLC-MS, et des LOD similaires ont pu être déterminées. Concernant les deux autres familles de lipopeptides, des LOD similaires ont été déterminées, confirmant l'efficacité du test, à l'exception de celle pour la mycosubtiline dans le LB, le niveau d'interférences observé ne permettant pas une détermination fiable de celle-ci.

La méthode a ensuite été intégrée dans un *workflow* entièrement automatisé pour le criblage d'échantillons environnementaux inconnus et en utilisant deux souches de référence différentes de *B. subtilis* basé sur l'utilisation du piqueur de colonies de REALCAT et d'un robot de pipetage pour la mise en œuvre du test (Figure 34).

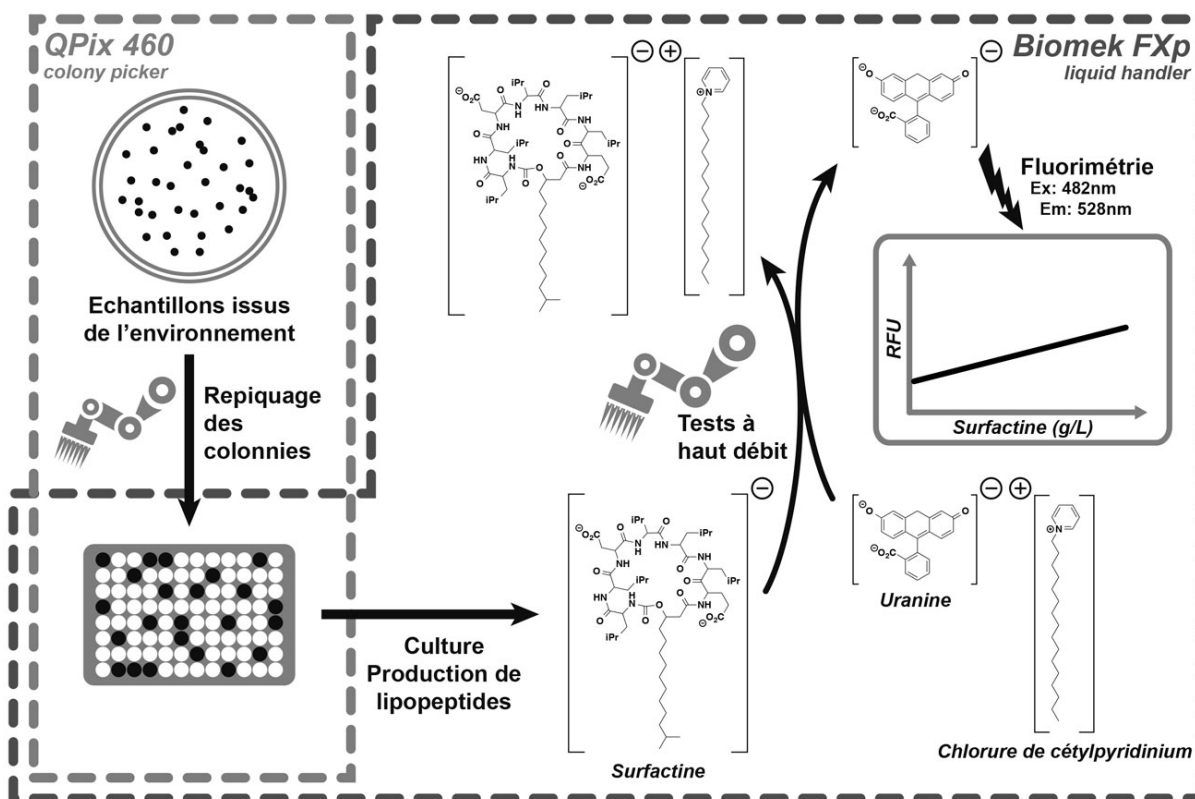


Figure 34 : Stratégie de criblage d'échantillons bactériens issus de l'environnement pour la production de lipopeptides à l'aide du nouveau test fluorescent basé sur l'utilisation d'uracine et de chlorure de cetylpyridinium.

Pour établir une preuve de concept, nous avons réalisé le criblage de 7 souches, dont 5 inconnues issues de l'environnement, identifiées au préalable à l'aide de la méthode MALDI que j'ai précédemment décrite. En conditions réelles de production des lipopeptides, notre méthode de criblage nous a permis de retrouver des résultats équivalents aux analyses faites par HPLC-MS, en particulier pour les souches de référence. Cependant une légère surestimation systématique des concentrations mesurées a pu être notée dans ces conditions. Notons également que l'une des souches a conduit à l'obtention d'un faux positif avec notre méthode fluorescente lorsque l'on compare avec l'analyse HPLC. Ces deux phénomènes nous ont suggéré que certaines souches sont en mesure de produire des molécules qui ne sont pas des lipopeptides mais qui sont tout de même capables d'interférer avec les composants du test, comme dans le cas du LB, mettant en évidence une limitation de ce dernier. Au final, nous avons tout de même pu valider notre nouvelle approche, laquelle nous a effectivement permis de mettre en évidence des différences de production de lipopeptides entre le milieu LB et Landy pour les souches criblées, et nous permettant également de découvrir 3 nouvelles souches productrices. Ces travaux ont fait l'objet d'une première publication dans le *Biotechnology Journal* en 2019.<sup>91</sup>

Par la suite, nous avons été amenés à développer une seconde méthodologie de criblage dans le cadre de la thèse de la Dr. Yuka Munakata, doctorante sous la supervision de la Pr. Sophie Sle Zack-Deschaumes (Laboratoire Agronomie et Environnement, LAE), afin d'aller rechercher de nouvelles souches bactériennes endophytes productrices de lipopeptides antimicrobiens, isolées à partir de racines de Vétiver originaires de l'île de La Réunion. Pour cela, nous avons proposé cette fois un pipeline plus complet, impliquant toujours l'isolement de bactéries et leur culture pour la production de lipopeptides, mais également leur séquençage,

l'évaluation de leur activité antibactérienne et antifongique sur gélose et en milieu liquide en plaque, ainsi que l'analyse systématique en masse des surnageants de culture (Figure 35).

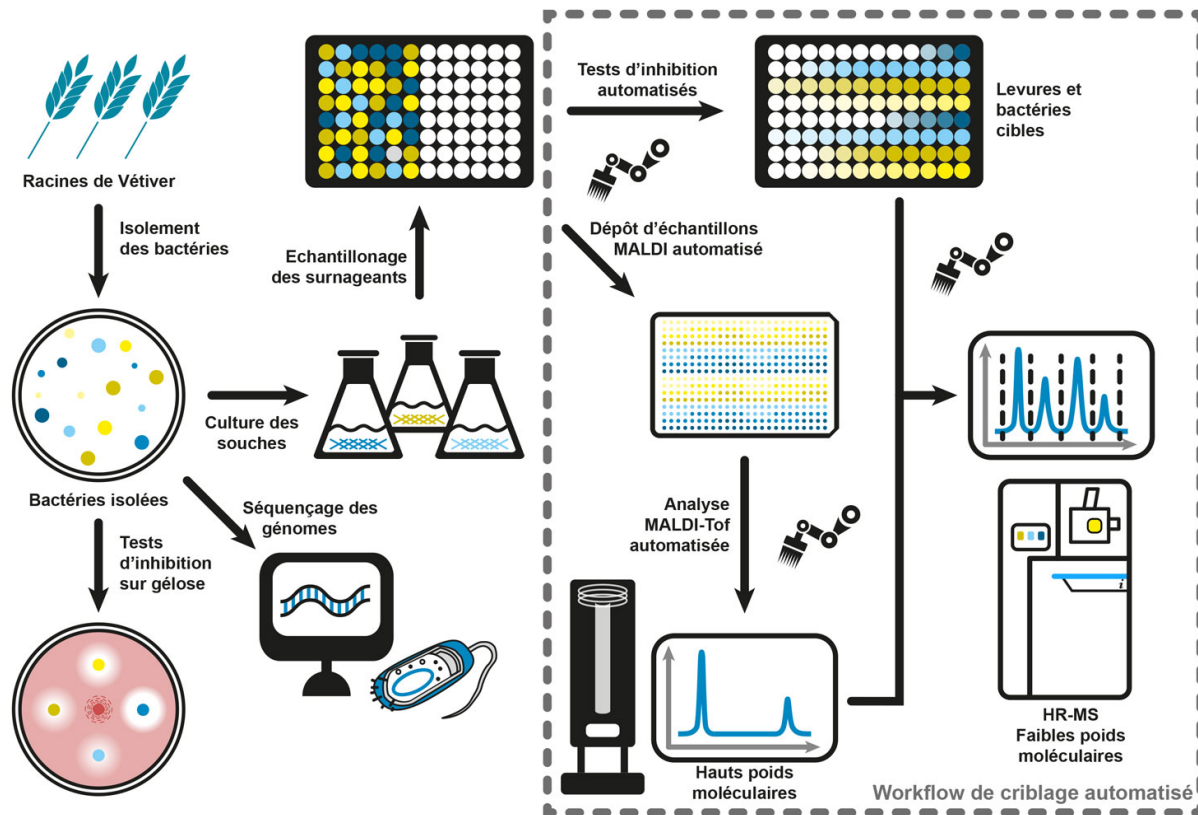


Figure 35 : Stratégie de criblages de souches bactériennes isolées à partir de racines de Vétiver, pour leur capacité à produire des lipopeptides antimicrobiens, lesquels sont identifiés et leur action quantifiée à l'aide de tests d'inhibition et d'analyses en masse automatisés.

Pour cette étude, Yuka a commencé par isoler et sélectionner 31 bactéries endophytes à partir de racines de vétiver. Ces bactéries, affiliées aux genres *Bacillus*, *Enterobacter*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Microbacterium* et *Yokenella*, ont précédemment montré des taux d'inhibition élevés contre le champignon *F. graminearum* dans des cultures in vitro. Ici, nous avons évalué leur capacité à inhiber la croissance mycélienne de deux autres espèces phytopathogènes bien connues de Fusarium, *F. culmorum* et *F. oxysporum*. Cette étape a été réalisée de manière classique sur gélose. Selon le genre bactérien, le taux d'inhibition détecté a varié entre 1,1 et 53,4 % et 0 et 55,3 % vis-à-vis de *F. culmorum* et *F. oxysporum*, respectivement. Ce sont les bactéries appartenant aux genres *Serratia* et *Bacillus* qui ont présenté les taux d'inhibition les plus élevés contre ces deux cibles. En parallèle, les différentes souches ont été mises en culture dans deux milieux de culture (KingB et Nutrient Broth (NB)) de manière à les faire produire, si possible, les molécules responsables de leur capacité antifongique, et/ou antibactérienne. Les capacités inhibitrices des surnageants produits ont alors été testées sur les trois souches de champignons précédentes, là encore sur gélose. Comme nous nous y attendions, seule une partie des capacités inhibitrices ont été retrouvées, avec en particulier les souches de *Bacillus*. Ceci a été corrélé à la mesure de l'inhibition de la croissance d'*E. coli* et de *S. cerevisiae* par les mêmes surnageants, cette fois-ci réalisée de manière automatisée en plaques, en milieu liquide. Le genre *Bacillus* étant connu, comme je l'ai précédemment mentionné, pour sa capacité à produire des lipopeptides antimicrobiens, nous avons donc terminé notre

approche par la recherche des molécules de cette famille, en nous appuyant sur notre capacité à réaliser des analyses en masse à haut débit. Pour cela nous avons fait appel de manière complémentaire à la spectrométrie de masse MALDI, qui permet de détecter des molécules avec des poids moléculaires compris entre 500 Da et 200k Da, et la spectrométrie de masse à haute résolution par ionisation de spray couplée à de l'HPLC, qui permet un fractionnement des extraits et l'analyse des molécules de plus faible poids moléculaire (50 Da – 2k Da). La préparation des échantillons pour ces deux types d'analyse a là encore été réalisée de manière automatique. En résultats, nous avons effectivement mis en évidence la présence de surfactines (C13, C14, C15 C16 et C17), mais également de plipastine A et B (de la famille des fengycines), lesquelles présentent bien des effets antifongiques, en accord avec nos tests d'inhibition sur les souches de *Fusarium*. De manière intéressante, nous avons pu observer que nos souches de *B. subtilis* et *B. tequilensis*, à l'exception de l'une d'entre elles, ont montré de manière similaire des pics avec des m/z supérieurs à 3000 Da dans les spectres de masse de leurs surnageants. Ces composés pourraient correspondre à certaines bactériocines, telles que la subtilosine A ou une variante, qui ont un poids moléculaire d'environ 3400 Da. Ils pourraient alors expliquer pourquoi ces souches ont également montré des activités antibactériennes. Ces travaux, qui ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Microorganisms* en 2022,<sup>92</sup> sont aujourd'hui poursuivis par l'équipe de Sophie Sle Zack-Deschaumes, notamment afin de tester les souches de Bacillus mises en évidence pour des application en biocontrôle, *in planta*.

**Résumé de ma contribution :** Dans le cadre du projet CO4, j'ai été principalement impliqué dans l'encadrement de la première moitié de la thèse d'Eléonore Méphane, celle-ci ayant passé les 18 premiers mois à Lille pour mettre au point les cocultures en erlenmeyer et en BioLector. Je l'ai également aidé à développer un test colorimétrique pour estimer la viabilité des spores de *Fusarium*, qui a depuis été repris et amélioré dans le cadre de la thèse de Violette Hamers, en cours avec l'entreprise InVivo. Concernant le criblage des lipopeptides, j'ai personnellement réalisé les expérimentations pour la mise au point de notre test à l'uranine, puis j'ai été impliqué dans l'encadrement de la partie de la thèse de Yuka Munakata qui s'est déroulée sur REALCAT et qui a conduit aux résultats obtenus avec les souches de microorganismes collectées à partir des racines de Vétiver.

### **Thématique 2.3 : autres stratégies de criblage pour l'étude des activités biologiques de molécules biosourcées**

En plus de ces deux principales thématiques de recherche, j'ai également été amené à développer un panel de stratégies de criblage supplémentaires, la grande majorité visant à tester l'activité biologique (cytotoxique, antimicrobienne, antioxydante, biostimulante, etc.) de nombreuses familles de molécules issues de sources variées de biomasse, notamment animale. Je ne rentrerai pas ici dans les détails, ces projets étant assez loin de ma thématique de recherche principale. Je pourrai cependant rapidement mentionner les travaux réalisés sur les déchets de la pêche et la lutte contre la mélanose des crustacés. La mélanose est un phénomène de brunissement qui est phénomène qui touche un grand nombre d'aliments (fruits, légumes, champignons, mais également crustacés), et qui provient de la formation de mélanine *post-mortem* par polymérisation de divers phénols intracellulaires (notamment de la tyrosine) lors de leur libération au cours de l'apoptose. Celle-ci est catalysée dans l'organisme par des enzymes de la famille des phénol oxydases (PO), lesquelles comprennent les tyrosinases, catéchol oxydases et les laccases, même après la mort de celui-ci. Bien que ce phénomène ne rende pas l'aliment impropre à la consommation, il peut modifier ses propriétés organoleptiques, et entraîne également l'apparition de « tache noires » à sa surface ce qui a

tendance à faire fuir le consommateur, entraînant des pertes industrielles importantes (Figure 36).<sup>93</sup> En conséquence, l'industrie agroalimentaire a très tôt déployé des méthodes pour limiter ce phénomène. Celle qui est très largement la plus répandue, et qui est utilisée depuis les années 1950, consiste en l'emploi de sulfites, par saupoudrage ou par trempage en bain par exemple, lesquels sont connus pour être de très bons inhibiteurs des PO.<sup>94</sup> Il s'agit d'ailleurs de la raison de leur ajout dans le vin, pour éviter que celui-ci ne s'oxyde une fois mis en bouteille et conservé. Cependant, dès le début de leur utilisation industrielle, les premiers recensements de cas de réactions de type allergique suite à l'ingestion d'aliments traités sont apparus : asthme, anaphylaxie, dermatite, urticaire, hypotension, douleurs abdominales et diarrhées. A tel point que dès 1986, la FDA (*Food and Drugs Administration*) demande que les sulfites ne soient plus autorisés pour le traitement des fruits et légumes frais aux États-Unis, par révocation de leur statut GRAS (*Generally Recognized as Safe*), interdiction a bien évidemment été appliquée en Europe depuis. Et c'est sans parler des risques encourus par les cultivateurs et pêcheurs, lesquels manipulent et épandent des quantités de sulfites très importantes, parfois sans aucun équipement de protection comme c'est le cas sur les bateaux de pêche des crevettes en Afrique par exemple. Cette interdiction s'est depuis intensifiée et tend à s'étendre à un panel beaucoup plus large de produits dont le vin et les crustacés.

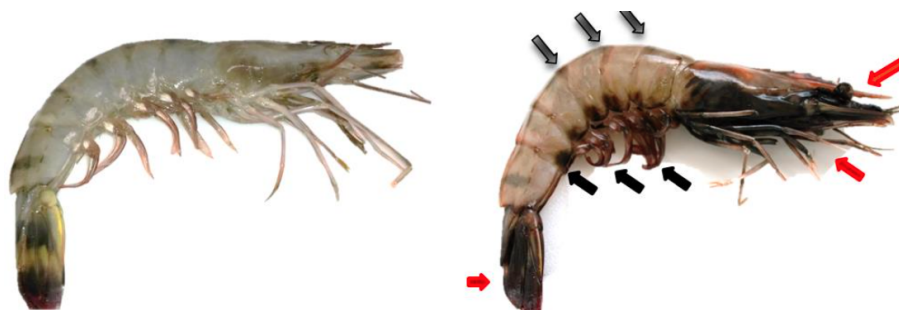


Figure 36 : Crevette (*Penaeus monodon*) avant (à gauche) et après (à droite) l'apparition des « taches noires » liées au phénomène de mélanose.

En réponse, deux alternatives s'offrent alors pour lutter contre la mélanose et les pertes économiques qu'elles engendrent. La solution la moins onéreuse et la plus vertueuse consisterait à éduquer le consommateur, de la même façon que cela l'a récemment été fait pour le jambon et la diminution de l'utilisation des nitrites. Cependant cette approche montre des résultats peu significatifs tant qu'elle n'est pas associée à une véritable politique d'interdiction des pouvoirs publics vis-à-vis de la vente des produits traités avec les substances concernées, ainsi qu'à une véritable campagne de sensibilisation à grande échelle. Néanmoins plusieurs expériences sociales ont été menées dans ce sens à l'UMRT BioEcoAgro afin de promouvoir ce type de solution. L'alternative serait de remplacer les sulfites et leur capacité d'inhibition des phénol oxydases par des molécules ayant une innocuité démontrée, et étant si possible biosourcées et non polluantes pour l'environnement compte-tenu de leur méthode d'épandage. C'est ce type de molécule que nous avons essayé de cribler dans le cadre d'une série de projets, d'abord à travers la thèse d'Estelle Zeyer, puis à travers d'autres collaborations que j'ai notamment menées avec la Dr. Muriel Billamboz (laboratoire de Chimie Durable et Santé de l'école d'ingénieurs JUNIA-HEI) et le Dr. Cédric Le Bris (UMRT BioEcoAgro). A l'aide d'un test générique de mesure de l'activité inhibitrice de composés sur les phénol oxydases issues d'extraits de crevettes basé sur l'utilisation du MBTH (3-méthyl-2-benzothiazolinonehydrazone), que nous avons publié dans *Food Control* en 2018,<sup>95</sup> nous avons ainsi testé un large panel de molécules. Nous avons commencé par recalculer les constantes d'inhibition des 40 inhibiteurs décrits dans la littérature, aucune étude comparative n'ayant jusque-là été menée dans les mêmes



conditions. Ceci nous a permis de confirmer l'efficacité par rapport aux sulfites de certains composés comme le 4-hydroxyresorcinol ou l'acide kojic, et à l'inverse de mettre en évidence un grand nombre de faux positifs pourtant proposés par plusieurs études antérieures. Suite à cette première étude, nous avons voulu voir si nous pouvions utiliser les produits issus de la réaction de Maillard à partir de coproduits de la pêche (extraits de carapace de homard, résidus d'arête de poisson, extraits de mollusques, etc.) lesquels pouvant présenter des activités antioxydantes. Des résultats peu concluants ont malheureusement ici pu être obtenus. Suite à cela nous avons décidé de cribler la chimiothèque de Muriel Billamboz, laquelle est composée de plusieurs centaines de molécules dont une part importante provenant de la synthèse organique de dérivés de synthons biosourcés. Plusieurs *hits* ont ainsi pu être mis en évidence, dans certaines molécules présentant des fonctions thiol libre, et dont on suspecte que le mécanisme d'action sur les PO puisse être proche de celui des sulfites. Enfin, nous avons conclu cette étude en criblant un large panel de dérivés de l'acide kojic, estérifié sur l'une ou l'autre de ses fonctions alcool avec des chaînes aliphatiques et aromatiques, linéaires et branchées, greffées sous la forme d'esters, de carbonates ou de carbamates. En résultat nous avons pu démontrer que la longueur de la chaîne jouait un rôle important dans la capacité inhibitrice des PO de nos extraits de crevettes, avec la diminution de la constante d'inhibition par un facteur 100 dans le cas du dérivé disubstitué avec des esters de butanoate et de pentanoate. Ces résultats n'ont pas encore fait l'objet d'une publication mais ils seront très certainement utiles pour la recherche de nouvelles alternatives aux sulfites dans le cadre de projets ultérieurs menés au sein de l'UMRT BioEcoAgro.

**Résumé de ma contribution** : Pour ce projet, je suis arrivé à Lille au début de la seconde année de thèse d'Estelle Zeyer, laquelle avait beaucoup de difficulté à obtenir des résultats probants pour l'activité inhibitrices des molécules testées. Je lui ai alors proposé la mise au point du test au MBTH et son adaptation sur REALCAT, que nous avons réalisée ensemble sur ses extraits de crevette, donnant les résultats ayant permis d'écrire sa publication de thèse. Suite à la thèse, j'ai repris le projet de mon côté, notamment avec le Dr. Benoit Cudennec (UMRT BioEcoAgro) pour la partie sur la réaction de Maillard, et à travers une première collaboration avec Muriel Billamboz (JUNIA-HEI) réalisée dans le cadre de deux stages de Master 2 que j'ai encadrés sur REALCAT.

#### **Thématique 2.4 : nouveaux systèmes de diagnostics à haut débit pour la détection de maladie et la recherche de nouveaux médicaments**

De la même façon, et sans que cela soit en lien direct avec mon projet de recherche, j'ai également été à l'origine de plusieurs projets de diagnostic médical utilisant les robots de la plateforme REALCAT. Ces projets se sont basés sur la nouvelle technologie de criblage en spectrométrie de masse MALDI que j'ai présentée précédemment, et que j'ai eu l'occasion d'adapter à la détection et à la quantification d'autres types de molécules. Des premiers travaux, réalisés dans le cadre du projet Ins-Spect mené avec les équipes des Pr. Jean-Sébastien Annicotte (European Genomic Institute for Diabetes, EGID) et Pr. Benoît Deprez (Institut Pasteur de Lille), nous ont permis de mettre au point un tout nouveau système de quantification d'insuline permettant d'analyser 384 échantillons en moins d'une heure (Figure 37). Ce système pourrait être utilisé comme alternative moins chère et plus rapide au test ELISA pour le diagnostic médical précoce de maladie liées à cette hormone, avec en premier lieu le diabète, ce qui a abouti sur une étude de marché et une prématuration auprès de la SATT Nord (société d'accélération du transfert de technologies). En parallèle nous avons également utilisé cette nouvelle approche pour l'étude de la sécrétion d'insuline sur modèle cellulaire murin Min6 (cellules pancréatiques  $\beta$ ), après avoir soumis les cellules à une transfection

avec des ARN interférents (siRNA) ou les avoir incubées en présence d'une banque de composés organiques. Cette étude, réalisée sur plus de 1600 composés, a donné de très bons résultats, qui nous ont permis de valider expérimentalement cette nouvelle stratégie de criblage entièrement automatisée, pour la recherche de nouveaux médicaments potentiels contre le diabète de type 2, et pour la compréhension des facteurs influant la maladie. Les résultats nous ont également permis de mettre en évidence plusieurs molécules qu'il sera intéressant de tester plus en détail. Cette première preuve de concept a fait l'objet d'une récente publication dans *Cells* en début 2023.<sup>96</sup> Comme suite, ce projet devrait prochainement découler sur l'exploration d'une bibliothèque de siRNA ciblant environ 20000 gènes et d'une bibliothèque chimique > 100000 composés, toutes deux disponibles à l'Institut Pasteur de Lille.

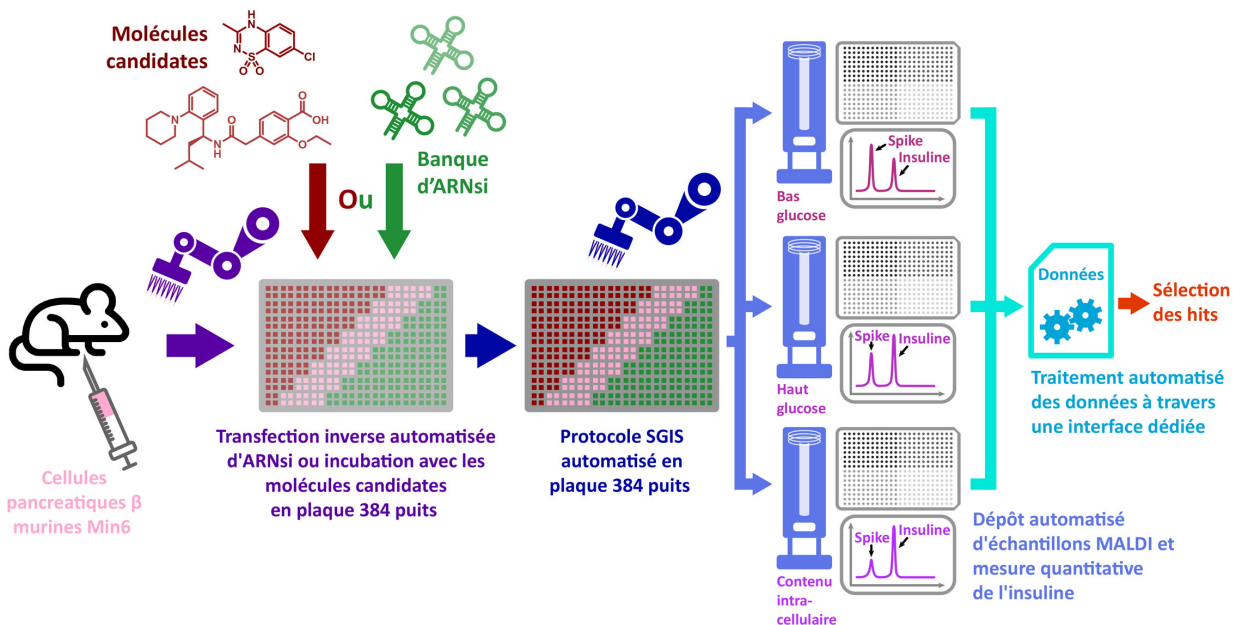


Figure 37 : Approche de quantification à haut débit d'insuline développée durant le projet Ins-Spect, combinant une méthode robotisée d'incubation de cellules pancréatiques murines en présence de médicaments potentiels (molécules organiques ARNsi) avec une analyse MALDI automatisée jusqu'au traitement des résultats.

En parallèle, nous avons également appliqué notre approche MALDI à haut débit pour du profilage protéique d'échantillons humains, là encore dans le but de pouvoir effectuer le diagnostic précoce de plusieurs maladies. Nous avons notamment travaillé sur des échantillons de salive pour tenter de voir si nous pouvions déceler des marqueurs protéiques de l'ostéoporose. Mais nous nous sommes surtout concentrés, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Laurent Dubuquoy (Institute for Translational Research in Inflammation, INFINITE), et mon collègue spécialisé en spectrométrie de masse, le Dr. Christophe Flahaut (UMRT BioEcoAgro), à tenter de détecter la présence de marqueurs protéiques de la maladie alcoolique du foie dans des échantillons sanguins. Après une série de premiers résultats prometteurs obtenus sur un petit échantillon de patients, nous avons obtenu un financement de la part du fonds d'aide à la recherche et à l'évaluation en hépato-gastroentérologie (FARE) pour appliquer notre approche de criblage sur un panel plus large afin de confirmer nos résultats de manière statistique. Sur le plan technique, notre approche repose sur la combinaison d'un système de billes magnétiques greffées avec des chaînes hydrophobes de différentes longueurs pour la captation fractionnée des protéines de l'échantillon avec notre système d'analyse MALDI pour l'identification de ces dernières. Ce projet est actuellement encore en cours et a depuis été repris par le Dr. Quentin Haguet.

**Résumé de ma contribution :** J'ai personnellement été à l'origine du projet Ins-Spect, tant sur le plan technique qu'au niveau de l'obtention du financement. Nous avons, avec Mickael Chevalier, alors doctorant à l'UMRT BioEcoAgro, adapté la méthode MALDI à haut débit à la détection d'insuline, notamment en développant un système d'étalon interne nous permettant de rendre cette analyse quantitative. De la même façon, afin de pouvoir traiter les résultats de manière rapide, notamment la détection automatisée des masses et le calcul des concentrations, j'ai été amené à programmer une nouvelle interface capable de directement prendre en charge les résultats de l'appareil. Cette dernière, ainsi que le développement technique de la méthode ont fait l'objet d'une déclaration d'invention, laquelle a conduit à une étude de marché et au financement du projet Ins-Spect sous la forme d'une prématuration par la SATT Nord, pour laquelle j'ai également été impliqué dans l'encadrement du Post-Doctorant, le Dr. Clément Delannoy, chargé de mener les expérimentations. Concernant les projets de diagnostic par recherche de marqueurs protéiques, j'ai principalement été impliqué dans la réalisation des expérimentations, et j'ai également participé au montage de la demande de financement FARE pour le projet sur la maladie alcoolique du foie. J'ai également été chargé de faire l'interface avec l'équipe du Pr. Laurent Dubuquoy, notamment dans le cadre de la sélection de la nouvelle cohorte de patients à analyser.

**Lien avec mon projet de recherche :**

Assez éloignées de la biocatalyse enzymatique, et encore plus de la catalyse hybride et digitale, les thématiques de cet axe 2 ne sont pas en lien direct avec mon projet de recherche propre. Cependant, elles m'ont permis d'acquérir un solide bagage technique, en particulier dans le haut débit et la programmation, lesquels me seront essentiels pour le criblage futur des matériaux multi-catalytiques. A titre d'exemple, j'ai déjà transposé mon expérience en fermentation sur le BioLector à l'utilisation de ce dernier pour le criblage de réactions hybrides en milieux hétérogènes (solide/liquide), lesquels sont assez proches en termes de comportement physique (mélange, sédimentation, etc.) des fermentations mettant en jeu des pelotes de champignon. De la même façon, la méthodologie d'analyse MALDI a depuis été adaptée à d'autres thématiques plus proches de mon activité de recherche principale, comme dans le cas du projet PLASTILOOP2.0 pour lequel nous étudions la dégradation enzymatique de polymères aromatiques pétrosourcés, et je compte bien évidemment la réutiliser à de nombreuses reprises pour compléter le panel de méthodes analytiques à ma disposition, surtout dans le domaine de la dégradation et de la synthèse de polymères.

Sur le plan thématique, ces projets m'ont amené à étudier et produire un très large panel de molécules biosourcées, en particulier celles provenant de la biomasse lignocellulosique, lesquelles seront le cœur de cible des voies hybrides que je compte développer. Par extension, ces années sur REALCAT m'ont permis de rencontrer un nombre très important d'acteurs académiques mais aussi industriels, du domaine de la valorisation de la biomasse et des bioraffineries, lesquels seront impliqué dans une part importante de mes futurs projets, en me permettant notamment d'en financer une partie. A ce titre, je suis désormais reconnu dans ce domaine ce qui me permet de recevoir de plus en plus de sollicitations de la part d'entreprises désireuses de développer ce type de thématique avec l'UCCS, et cela m'a déjà permis à plusieurs reprises de leur proposer une voie complémentaire hybride aux voies catalytiques plus « classiques » auxquelles ils pensaient faire appel en premier lieu.

### ***Axe 3 : Développement du concept de catalyse hybride en synthèse : application à la valorisation de molécules biosourcées***

Laboratoires :	UMR Transfrontalière BioEcoAgro Unité de Catalyse et Chimie du Solide (UCCS)
Collaborateur·ice·s principaux·ales	Pr. Renato Froidevaux (UMRT BioEcoAgro) Dr. Robert Wojcieszak (UCCS) Pr. Franck Dumeignil (UCCS) Pr. Thierry Loiseau (UCCS) Pr. Anne Zaparucha (Génoscope)
Nombre total de publications :	4 (dont 3 en auteur de correspondance) + 1 chapitre d'ouvrage (1 <sup>er</sup> auteur)
Communications orales :	2 internationales + 1 nationale

En parallèle de mes activités sur REALCAT, j'avais à cœur de pouvoir développer ma propre thématique de recherche, comprenant notamment des aspects plus fondamentaux. Compte-tenu de mon attrait pour l'interface entre les disciplines scientifiques, la biocatalyse en synthèse organique en étant déjà un bon exemple, et grâce au formidable écosystème disponible en chimie et en biotechnologies sur le site Lillois (Laboratoire UCCS et UMRT BioEcoAgro respectivement), je me suis naturellement intéressé à trouver un moyen de faire cohabiter ces deux mondes. Ce faisant, mes projets de recherche se sont doucement déplacés de la synthèse biocatalytique au développement de procédés que l'on qualifiera d'« hybrides », mettant en jeu des catalyseurs biologiques (enzymes dans ce cas) et des catalyseurs chimiques (nanoparticules métalliques supportées en l'occurrence). Ce champ disciplinaire est très jeune, et si les tout premiers très rares exemples remontent aux années 90, on peut estimer qu'il a vraiment commencé à susciter un véritable intérêt par la communauté scientifique à partir des années 2010. Compte-tenu de son caractère très récent et de la méconnaissance dont les concepts qui le régissent sont encore entourés, j'aimerais proposer d'aborder ce troisième axe par une rapide introduction sur la terminologie et les objectifs de ce champ disciplinaire.

#### **Introduction : les systèmes multi-catalytiques en synthèse, leur abondance dans les domaines de la chimie et de la biologie, et les verrous qu'il reste encore à lever**

Le développement de procédés chimiques plus éocompatibles est désormais reconnu comme une priorité. La raréfaction des ressources fossiles associée au changement climatique impose de repenser complètement nos habitudes de consommation et notre modèle de production. Depuis la formalisation du concept de *chimie verte* par Anastas et Warner,<sup>97</sup> les chimistes recherchent des alternatives plus efficaces à la synthèse conventionnelle, qui soient moins énergivores, économiquement plus durables et plus respectueuses de l'environnement. Les procédés catalytiques peuvent répondre à la plupart de ces exigences, mais ils reposent traditionnellement sur l'utilisation d'un seul catalyseur à la fois, qu'il soit chimique ou biologique. Quand ils sont utilisés de manière unitaire, ces catalyseurs sont limités à un nombre restreint de réactions, et les chimistes comme les biologistes font alors appel à la combinaison de plusieurs d'entre eux afin d'accroître le nombre de possibilités réactionnelles. On observe d'ailleurs une augmentation de cette tendance depuis quelques années, très probablement au regard de la nécessité toujours croissante de trouver des alternatives viables au pétrole comme source de carbone. En effet, si la biomasse constitue la plus importante ressource sur terre, qui plus est renouvelable à l'échelle humaine dans une certaine mesure, la diversité des molécules qui la composent est très nettement supérieure à celle des hydrocarbures, et il convient alors de trouver autant de voies catalytiques pour maximiser la valorisation de

cette dernière. Or, ces nouvelles voies réactionnelles combinant plusieurs catalyseurs peuvent être effectuées selon différents schémas réactionnels qu'il convient de décrire au mieux afin d'en comprendre les limitations et de pouvoir mettre au point les procédés les plus efficaces et les plus économiques en atomes et en énergie.

### **Terminologie des procédés multi-catalytiques**

#### Procédés en « two-pots/two-steps » (2P2S)

Avant de définir selon quel agencement réactionnel deux catalyseurs peuvent interagir l'un avec l'autre, il est essentiel de décrire le type général de procédé dans lequel ils vont intervenir. Parmi les différentes possibilités, la première - et la plus simple - consiste à mettre au point un procédé au sein duquel les deux étapes catalytiques sont découplées : le premier catalyseur est introduit avec ses substrats dans un premier récipient (ballon, réacteur, etc.) et la réaction est réalisée. Les produits de cette dernière sont alors purifiés pour servir de substrats à la seconde étape catalytique. Ce type d'enchaînement n'est pas nouveau et correspond à ce qui est historiquement pratiqué, avec la synthèse dite « multi-étapes ». Évidemment, le principal désavantage de ce type de procédé « two-pots/two-steps » (2P2S) réside dans la nécessité d'une étape de purification intermédiaire qui est, au regard des nombreuses méthodes disponibles à l'heure actuelle, très souvent coûteuses en énergie, en solvants, ou en infrastructures (Figure 38). Pour limiter ces coûts, il est possible de cantonner l'étape de purification à la soustraction du premier catalyseur du milieu réactionnel, la seconde réaction intervenant directement sur le brut réactionnel. Si ce type de réaction respecte déjà plus les principes de la *chimie verte*, il reste loin d'être optimal. Ajoutons à cela que si ce type de procédé permet de simplifier le contrôle de l'efficacité des deux catalyseurs grâce à des conditions réactionnelles indépendantes, il demeure le moins flexible concernant la combinaison de catalyseurs, avec uniquement la possibilité de faire travailler les catalyseurs de manière séquentielle, sans que ceux-ci puissent coopérer pour atteindre de meilleurs rendements ou une diversité de produit plus importante par exemple.

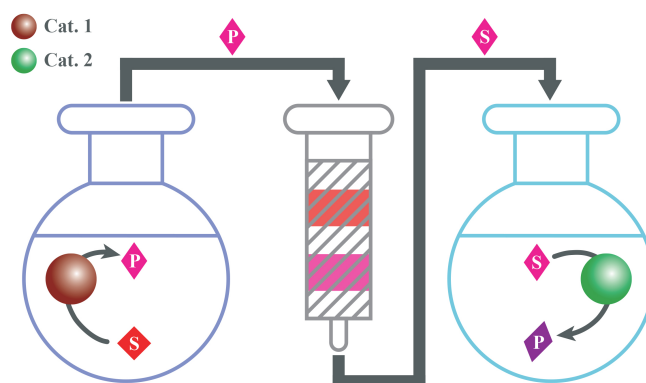


Figure 38 : Schéma d'un procédé réactionnel multicatalytique en 2P2S. Le produit (P) de la première réaction est purifié avant de servir de substrat (S) pour la seconde réaction.

(Cat. = catalyseur, S = substrat, P = produit)

Aussi, afin de justement permettre de profiter de toutes les synergies qu'il est possible de mettre en place entre deux catalyseurs (déplacement d'équilibre thermodynamique, activation mutuelle, recyclage des cofacteurs/cosubstrats, protection mutuelle contre le solvant, etc.), il est rapidement apparu aux chimistes, comme aux biologistes, que le procédé idéal devrait plutôt être réalisé dans un seul et même récipient, ou

en « *one-pot* ». Ces réactions offrent également comme principal avantage de supprimer l'étape de purification.

Procédés en « *one-pot/one-step* » et « *one-pot/two-steps* » (1P1S & 1P2S)

Dès lors, de nombreux acteurs de la chimie et de la biocatalyse se sont attelés à l'élaboration de réactions en *one-pot*. Cependant, la majorité de ces études emploie ce terme sans préciser le nombre d'étapes réalisées au sein de ce « *pot* » et encore moins de quelle manière elles sont agencées entre elles. *Stricto sensu*, cette terminologie devrait correspondre à des réactions dites en « *one-pot/one-step* » (1P1S) dans la mesure où cette qualification est censée décrire un procédé dans lequel tous les substrats et catalyseurs sont présents dès le départ dans un seul récipient (Figure 39).<sup>98</sup> Cependant, dans les faits, la très grande majorité des réactions dénommées *one-pot* décrivent des réactions au cours desquelles la première étape catalytique est réalisée par un premier catalyseur seul, suivi par l'ajout d'un second catalyseur à un instant donné, avec ou sans un substrat supplémentaire, pour réaliser la seconde étape du procédé. La réaction totale est alors bien réalisée dans un seul récipient en « *one-pot* », mais en deux étapes « *two-steps* » (Figure 40). S'il est important de faire cette distinction, c'est parce que les réactions en 1P1S présentent plusieurs avantages non négligeables sur les « *one-pot/two-steps* » (1P2S). Outre le fait que la logistique de mise en œuvre de la réaction s'en trouve grandement simplifiée (réaction en *batch* véritable, sans ajout ultérieur), les 1P1S offrent la mise en place d'effets de synergie entre les catalyseurs, en particulier au niveau du déplacement de l'équilibre réactionnel. En combinant, par exemple, une réaction thermodynamiquement irréversible avec une réaction équilibrée en une seule étape, l'équilibre général s'en trouve déplacé en faveur des espèces recherchées.

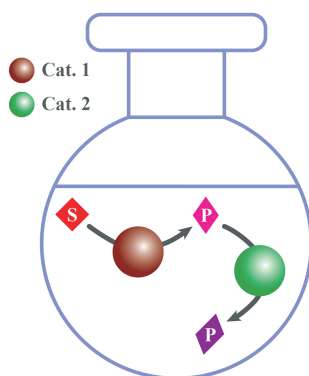


Figure 39 : Schéma d'un procédé réactionnel multi-catalytique en 1P1S. Les deux catalyseurs sont en présence dès le début de la réaction et travaillent de concert pour aboutir au produit final, souvent avec la mise en place d'effets de synergie.

(*Cat.* = catalyseur, *S* = substrat, *P* = produit)

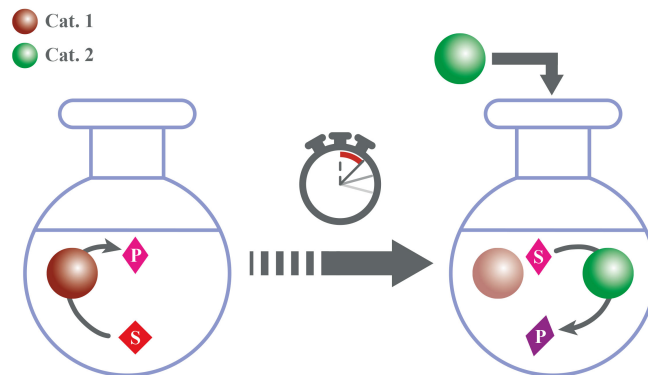


Figure 40 : Schéma d'un procédé réactionnel multi-catalytique en 1P2S. Le second catalyseur est ajouté extemporanément, après que le premier catalyseur a effectué la première réaction.  
(Cat. = catalyseur, S = substrat, P = produit)

#### Procédés en « two-pots/one-step » (2P1S)

Les procédés 1P1S représentent dès lors pour ainsi dire un idéal pour les chercheurs étudiant les systèmes multi-catalytiques et ils constituent un objectif prioritaire à atteindre lors de la combinaison de catalyseurs. Cependant, ils demeurent très complexes à mettre au point à cause de la cohabitation des deux catalyseurs nécessitant des conditions opératoires bien souvent très différentes, et pouvant dans certains cas mutuellement s'inactiver, ce qui explique leur moindre proportion dans la littérature. Cette difficulté s'accroît encore lorsque les catalyseurs en association sont de types et de natures très différents : couplage de catalyseurs homogènes et hétérogènes en chimie, ou plus encore, couplage de chémocatalyseurs avec des biocatalyseurs. Pour résoudre ces limitations, les chercheurs font souvent appel à des stratégies de compartimentation, permettant de confiner chaque catalyseur dans un environnement et sous des conditions opératoires définis. Deux stratégies sont alors déclinées : il est possible dans un premier temps de séparer les catalyseurs à l'aide d'une barrière physique qui peut présenter différentes natures : De très nombreux exemples sont décrits dans la littérature,<sup>99-101</sup> comme les membranes en PVDF (polyvinylidène fluoride), les parois cellulaires, les micelles, etc. Il est aussi possible d'utiliser une membrane liquide qui agit alors comme une barrière chimique filtrant les composés pouvant passer d'un compartiment à l'autre.<sup>102</sup> Ces procédés que l'on pourra qualifier de « two-pots/one-step » (2P1S) fournissent certes un moyen intéressant de faire cohabiter deux catalyseurs distincts (Figure 41), notamment en permettant de déplacer les équilibres thermodynamiques ou de supprimer l'étape de purification, mais ils partagent également plusieurs des désavantages des procédés en 2P2S, comme l'absence de synergie entre les sites catalytiques, la protection mutuelle contre le milieu réactionnel, ou l'activation mutuelle par exemple.

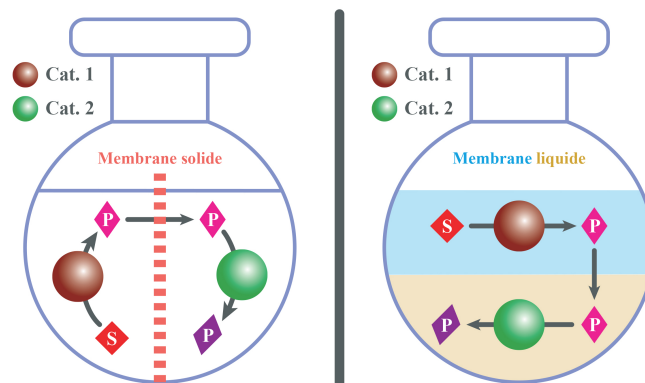


Figure 41 : Schéma de procédés réactionnels multi-catalytiques en 2P1S. À gauche, les deux catalyseurs sont séparés par une membrane solide (polymère, micelle, paroi cellulaire, etc.). À droite, les deux catalyseurs sont séparés par une membrane liquide (mélanges multiphasique, réacteurs séparés par un pont liquide, etc.).  
(*Cat.* = catalyseur, *S* = substrat, *P* = produit)

#### Procédés à base de matériaux multi-catalytiques

Aussi, une seconde stratégie encore plus efficace peut être développée, cette dernière consistant en la co-immobilisation des deux catalyseurs au sein d'un même matériau. Il en résulte alors non plus deux catalyseurs distincts, mais un seul matériau catalytique exhibant deux propriétés catalytiques différentes. Ces « matériaux multi-catalytiques » (MMC) offrent alors la possibilité de réaliser une véritable 1P1S, tout en bénéficiant des effets de compartimentation (Figure 42). Plusieurs stratégies et supports d'immobilisation ont dès lors déjà été développés, incluant les silices mésoporeuses, les zéolites, les nanoparticules bimétalliques, l'utilisation de polymères en tous genres, les nanoflowers, les « *metal-organic frameworks* » (MOF) ou encore les « *covalent-organic frameworks* » (COF) en chimie, et les « *cross-linked enzyme aggregates* » (CLEAs), hydrogels, les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) ou, plus simplement, la fixation sur supports solides en biologie. Chacun de ces supports et chacune de ces techniques présente une batterie d'avantages et d'inconvénients qui lui est propre, particulièrement sur le plan du contrôle de la disposition des sites catalytiques les uns par rapport aux autres, et est, à ce titre, d'efficacité variable pour l'élaboration d'un matériau catalytique. Figurent alors parmi les meilleurs systèmes catalytiques ceux qui permettent une localisation très finement contrôlée des sites actifs, offrant ainsi la possibilité de maximiser les synergies entre les catalyseurs par la protection de ces derniers au sein de microcanaux possédant un environnement physicochimique particulier, ou encore par la réduction de la distance du trajet des substrats/produits entre les différentes réactions catalysées. L'élaboration de ce type de matériaux multi-catalytiques, et plus particulièrement de ceux permettant de combiner des enzymes avec des catalyseurs chimiques hétérogènes, ainsi que la compréhension des mécanismes physicochimiques qui les régissent, représentent un challenge des plus passionnant, et qui constituera le cœur de mon projet de recherche.



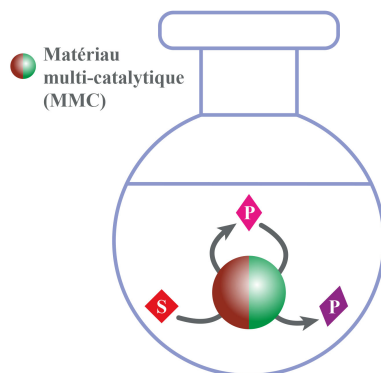


Figure 42 : Schéma d'un procédé réactionnel multi-catalytique en 1P1S mettant en jeu un matériau combinant les différents sites actifs.

(Cat. = catalyseur, S = substrat, P = produit)

### ***Nomenclature des différents types de réactions impliquées au sein des procédés multi-catalytiques***

En plus du type de procédé mis en place (1P1S, 1P2S, 2P1S ou 2P2S), il est possible de classer les réactions multi-catalytiques sous différentes terminologies en fonction de l'agencement des étapes catalytiques entre elles. Il est possible, pour un même type de procédé, d'agencer de manière très différente les deux catalyseurs sur le plan de l'ordre réactionnel, chacun de ces agencements ayant ainsi des objectifs en synthèse très différents. Dans la littérature, les publications faisant état du couplage plusieurs catalyseurs sont ainsi bien souvent répertoriées sous les termes de réactions dites en « *cascades* », en « *tandem* », en « *domino* », « *multi-étapes* », « *orthogonales* », « *parallèles* », « *cycliques* », etc. Ces termes sont employés de manière radicalement différente d'une étude à l'autre et cette différence est d'autant plus criante lorsque l'on compare des réactions en chimie et en biocatalyse. De nombreux auteurs ont ainsi proposé des classifications terminologiques précises, mais ces dernières n'ont généralement pas été adoptées par la suite, une nouvelle classification étant établie tous les deux ou trois ans.<sup>98,100,103-111</sup> La première, et souvent la plus reprise, est sûrement celle de Fogg et Dos Santos dans le domaine de la chimie, mais elle n'est pas parfaitement adaptée à la description des systèmes biologique, et il convient donc de la remodeler un peu.<sup>111</sup> Aussi, dans un souci de clarté, je proposerai brièvement ici une classification terminologique combinant cette dernière avec des concepts et terminologies décrits en biocatalyse.

#### *Réactions en « domino » ou en « cascade »*

Le premier type de réaction multi-catalytique qu'il est possible de décrire, et aussi le plus simple, est sûrement celui faisant intervenir un seul catalyseur, réalisant plusieurs transformations moléculaires successives (Figure 43). Ce type d'agencement est souvent qualifié de « *domino* », mais le terme de « *cascade* » catalytique est aussi souvent retrouvé, l'idée retranscrite ici étant le fait que l'opération suivante découle directement de l'opération qui la précède, les espèces intermédiaires étant bien souvent instables.<sup>112,113,109,114</sup> Contrairement à ce que proposent Fogg et Dos Santos, je regrouperai aussi sous cette terminologie les réactions catalysées par un seul catalyseur réalisant une succession de mécanismes catalytiques différents, ainsi que ceux changeant de mécanisme catalytique au cours de la réaction à la suite d'une « *activation* » par un paramètre extérieur. Ces deux types de réactions sont regroupés par Fogg et Dos Santos sous le terme de réactions « *auto-tandem* » et « *tandem-assisté* », mais je trouve que ces terminologies peuvent prêter à confusion quand il s'agit de réactions réalisées de manière conjointe par deux catalyseurs distincts. Plus encore, elles ne permettent pas de différencier ce type de catalyseur avec

les matériaux multi-catalytiques qui nous intéressent plus précisément ici. Notons d'ailleurs que les réactions en domino prennent généralement la forme de cycles catalytiques dans lesquels le catalyseur est régénéré, sans que cela ne soit le seul schéma possible. Ce type de réaction ne nous intéressera pas ici dans la mesure où il ne permet pas la combinaison de plusieurs activités catalytiques pour la diversification des procédés de synthèse, les deux activités étant directement dépendantes du catalyseur choisi.

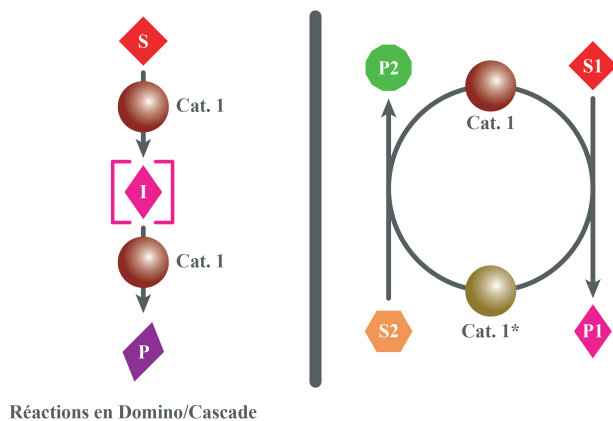


Figure 43 : Schémas de réactions multi-catalytiques en domino ou cascade. Dans la réaction de gauche, le catalyseur n'est pas modifié et agit consécutivement sur différentes molécules. Dans la réaction de droite, le catalyseur est modifié par une première réaction avec un premier couple substrat/produit, puis est régénéré au travers de son action sur un second couple.

(Cat. = catalyseur, S = substrat, P = produit, I = intermédiaire)

Il convient toutefois de mentionner que certains auteurs ont proposé des définitions très différentes, impliquant plusieurs catalyseurs, sous cette même terminologie. Tietze décrit les réactions en domino comme un « processus impliquant deux ou plusieurs transformations formant des liaisons (généralement des liaisons C-C) qui ont lieu dans les mêmes conditions de réaction sans ajout de réactifs et de catalyseurs supplémentaires, et dans lesquelles les réactions suivantes résultent de la fonctionnalité formée à l'étape précédente ». <sup>115</sup> Loin de la définition de Fogg et Dos Santos, celle-ci se réfère davantage aux types de réactions qui seront décrites ci-après comme des réactions tandem séquentielles, et montre parfaitement comment la même terminologie peut être utilisée pour décrire des concepts très différents.

#### Réactions en « tandem combiné »

Concernant les réactions faisant intervenir plusieurs espèces ou sites catalytiques, nous les regrouperons donc toutes sous le terme de réaction en « tandem ». L'idée retranscrite ici serait plutôt le fait que chaque catalyseur peut travailler seul, mais que leur association offre un ou plusieurs avantages, tels qu'une plus grande diversité de réactions catalysées, le déplacement de l'équilibre thermodynamique, ou encore l'activation de l'un des deux catalyseurs par l'autre. Précisons tout de même ici que cette terminologie est très souvent remplacée par celle de réactions en « cascade » dans le domaine de la biocatalyse, ce qui introduit un niveau de confusion supplémentaire entre les deux domaines. Une fois ce prérequis établi, il est possible de subdiviser les réactions en tandem en plusieurs catégories.

La première, qui est aussi la plus proche des réactions en domino, décrit des réactions faisant intervenir deux espèces catalytiques différentes en association au sein d'une seule et même étape catalytique, rendant cette dernière alors réalisable (Figure 44). Il ne faut pas la confondre avec un procédé en IP1S faisant intervenir un MMC. Ici, une seule étape catalytique est effectuée, conduisant à un seul produit. Nous pourrions la qualifier de réaction en tandem « combiné ». Le meilleur exemple de ce type de réaction

demeure celui des enzymes, qui font appel pour une partie d'entre elles à l'utilisation d'une espèce chimique exogène (phosphate de pyridoxal, thiamine pyrophosphate, hèmes et autres porphyrines) pour réaliser le cycle catalytique. Ceux-ci peuvent être divisés en deux groupes en fonction de leur force de liaison avec l'enzyme. Les groupes fortement liés sont généralement appelés groupes prosthétiques, tandis que les autres peuvent avoir des terminologies différentes.<sup>116</sup> Les deux peuvent être impliqués dans un tandem combiné tant qu'ils présentent une activité catalytique et sont donc régénérés à la fin de la réaction. Notons que la chimie a elle aussi très tôt développé ce type de systèmes, avec des exemples associant des catalyseurs de même type,<sup>117</sup> ou de types différents.<sup>118,119</sup> Ces derniers exemples suggèrent à quel point l'association de catalyseurs entre eux permet d'étendre la diversité des réactions qu'il est ainsi possible de catalyser.

#### Réactions en « tandem séquentiel »

Viennent ensuite les réactions faisant intervenir deux sites actifs séparés. Le premier type - et le plus répandu - concerne celui regroupant les réactions qui intègrent l'intervention de plusieurs étapes catalytiques séquentielles, conduisant, à partir d'un ou plusieurs substrats, à la formation d'un ou plusieurs produits, en passant par la génération d'intermédiaires stables, ou non, entre chacune des étapes.<sup>100,101,107</sup> Ces réactions seront appelées réactions en tandem « séquentiel », le (ou les) produit(s) de l'étape précédente servant de substrat(s) pour la suivante (Figure 44).

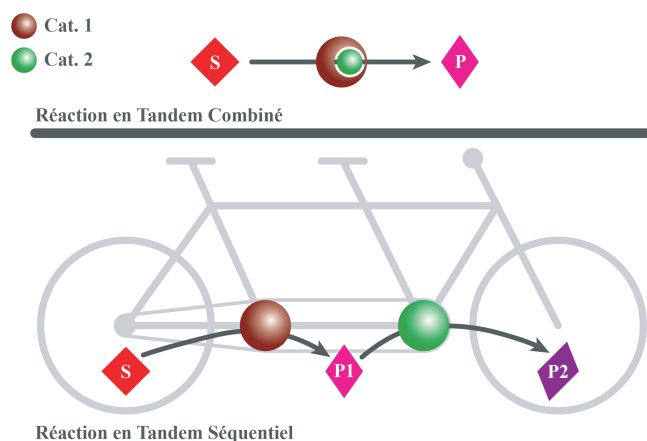


Figure 44 : Schémas de réactions multi-catalytiques en tandem combiné (en haut) et séquentiel (en bas).  
(Cat. = catalyseur, S = substrat, P = produit)

C'est le type de réaction qui se rapproche le plus de la définition de Tietze et qui est le plus souvent qualifié de cascade catalytique en biocatalyse. En raison de l'action successive du catalyseur suivant sur le produit du catalyseur précédent, les tandems séquentiels représentent les types de réaction les plus prometteurs pour la diversification des voies de synthèse, en combinant les sélectivités des catalyseurs et en ouvrant à chaque étape de nouvelles fonctions chimiques sur lesquelles agir.

#### Réactions en « tandem parallèle »

Il est aussi possible que des réactions fassent intervenir des catalyseurs différents fonctionnant de concert, sans que les différentes étapes ne se suivent selon un ordre précis. Ces réactions seront qualifiées de réactions en tandem « parallèle ». Leur particularité réside dans le fait qu'elles font toujours intervenir deux espèces réactionnelles qui sont respectivement à la fois le substrat de l'une des deux réactions et le produit de l'autre. Ces composés, que l'on pourra alors qualifier d'intermédiaires, sont très souvent utilisés en quantité catalytique dans la mesure où ils sont cycliquement générés par les deux réactions catalytiques.

L'un des exemples les plus significatifs pour ce type de réaction concerne la biocatalyse, dans les systèmes mis en place pour la régénération des cofacteurs comme les couples NAD/NADH et FAD/FADH<sub>2</sub>. Ces derniers font en effet office d'intermédiaires entre les deux enzymes pour leur permettre de réaliser la transformation qu'elles catalysent. Notons à ce propos que, selon les principes décrits en enzymologie, ces types de composés ne devraient pas être qualifiés de cofacteurs, mais bien de cosubstrats, dans la mesure où ils ne sont pas régénérés par l'enzyme au cours de l'étape biocatalytique.

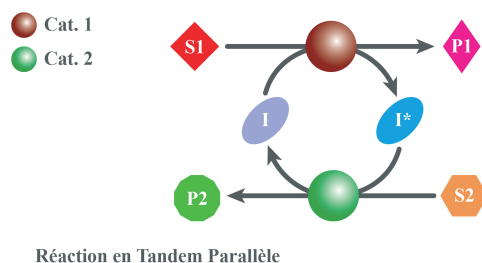


Figure 45 : Schéma d'une réaction multi-catalytique en tandem parallèle. (Cat. = catalyseur, S = substrat, P = produit, I = intermédiaire)

Le principal avantage des réactions en tandem parallèle en synthèse est justement la possibilité d'utiliser le couple d'intermédiaires en très faible quantité grâce à sa régénération en continu, soit parce que ce dernier est très coûteux, soit parce que l'une des deux entités chimiques qui le compose se trouve être un inhibiteur pour l'un des deux catalyseurs. Cependant, comme les deux transformations n'influent pas sur la structure des produits de l'autre, ce type de réaction ne permet généralement pas d'étendre le panel de transformations possibles.

#### Réactions en « tandem cyclique »

Une variante des réactions en tandem parallèle met en jeu deux catalyseurs distincts dont l'un transforme l'un des produits de l'autre afin de redonner les substrats de la réaction précédente. Ces réactions que l'on pourra qualifier de tandems « cycliques » ne font pas intervenir d'intermédiaire réactionnel, mais directement les substrats et produits de l'autre réaction, rendant ces dernières interdépendantes. Un bon exemple courant de ce type de réaction est la résolution cinétique dynamique (*dynamic kinetic resolution*, DKR), qui fait intervenir une étape de racémisation et une étape stéréosélective de manière simultanée. Dans la DKR, l'un des énantiomères du substrat est constamment racémisé par l'un des catalyseurs pour générer l'autre énantiomère, qui sera ensuite converti par l'autre catalyseur. Une variante, appelée « déracémisation cyclique » (DC), décrit une réaction tandem cyclique dans laquelle le second catalyseur n'agit pas sur l'énantiomère de substrat restant, mais sur le produit de la première étape catalytique, souvent une molécule achirale.<sup>120-122</sup> Cette méthodologie permet de déracémiser efficacement le mélange racémique en conduisant à la conservation d'un seul énantiomère de substrat à la fin du processus, au lieu de la formation d'un nouveau produit énantiomériquement pur. Malgré l'absence de formation d'un nouveau produit, ce deuxième type de réaction tandem cyclique est plus conforme au concept des réactions multi-catalytiques, où les catalyseurs travaillent ensemble sur le produit de l'autre, au lieu d'effectuer des réactions parallèles sans rapport entre elles. Une troisième variante de cette stratégie, appelée *minor enantiomer recycling* (MER), a été proposée par Moberg et décrit des réactions en tandems cycliques impliquant cette fois la conversion d'un substrat achiral en un mélange d'énantiomères.<sup>123,124</sup> Après cette première étape, le produit énantiomère indésirable, appelé « énantiomère mineur », est ensuite reconverti en substrat achiral. Cette stratégie bénéficie de son couplage avec des réactions secondaires thermodynamiquement favorables



l'autre. Si elles restent très intéressantes pour la mise en place de systèmes en 1P2S autonomes (ne nécessitant pas d'ajout à un instant donné), que l'on pourra alors qualifier de pseudo-1P1S, elles ne sont pas optimales dans la mesure où les rendements sont très souvent limités par le changement des conditions réactionnelles. On préférera alors les « véritables » 1P1S qu'il sera possible de faire fonctionner en continu.

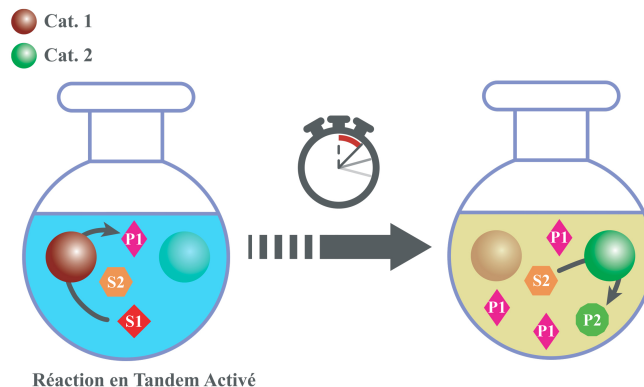


Figure 47 : Schéma de réaction multi-catalytique en tandem activé.

(Cat. = catalyseur, S = substrat, P = produit)

Combinaisons de plusieurs réactions en tandem pour l'expression d'effets de synergie

Ajoutons pour terminer qu'il est bien évidemment possible de combiner plusieurs des types de réactions précédemment cités pour former des systèmes catalytiques autorégénératifs. L'un des exemples les plus élégants à ce titre en biocatalyse reste celui développé par Kroutil et son équipe faisant intervenir séquentiellement une alcool déshydrogénase (ADH) et une transaminase (Cv-TA) pour la conversion de composés hydroxylés linéaires en diamines correspondantes à travers une réaction en tandem séquentiel en 4 étapes couplée à une réaction en tandem parallèle pour la régénération des cofacteurs et donneurs d'amine (Figure 48).<sup>125</sup> Ce procédé utilise en effet l'alanine déshydrogénase (AlaDH) pour à la fois redonner du NADH, consommé par l'ADH et de l'alanine, consommée par la Cv-TA, à partir des coproduits de ces deux enzymes et d'ammoniac en solution. Ce système a permis de générer efficacement des diamines linéaires à 8, 9, et 10 carbones qui sont très intéressants pour la synthèse de polymères comme le nylon par exemple.

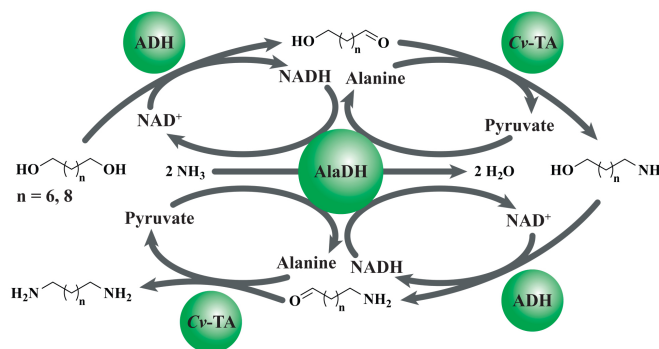


Figure 48 : Concept multi-catalytique couplant 4 réactions en tandems parallèles pour former un tandem séquentiel dans lequel les cofacteurs et donneurs d'amine sont régénérés à partir d'ammoniac en solution.

(Illustration inspirée de Sattler et coll.)<sup>125</sup> (ADH-hT : alcool déshydrogénase, AlaDH : alanine déshydrogénase, Cv-ωTA : transaminase)

Comme le montre efficacement cet exemple, tous les types de réactions multi-catalytiques susmentionnés peuvent être combinés pour accroître la diversité des voies réactionnelles disponibles pour la synthèse de produits chimiques. Un autre niveau de complexité peut ensuite être ajouté avec la combinaison des différentes catégories de procédé (nPnS), introduisant ainsi une grande diversité chimique dans la recherche et fournissant des outils à une industrie à la recherche de nouvelles solutions. Ainsi, une fois couplés, ce large panel de méthodes de combinaison fait des systèmes multi-catalytiques des armes particulièrement efficaces pour introduire de la diversité chimique dans une recherche et une industrie qui semblent parfois avoir du mal à se renouveler. Ces deux terminologies se trouvent résumées respectivement dans le Tableau 2 et le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différents types de procédés multi-catalytiques.

Type de procédé	Avantages	Inconvénients	Schéma du procédé
<i>two-pots/two-steps</i> (2P2S)	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Procédés flexibles</li> <li>→ Facilité de couplage des catalyseurs</li> <li>→ Réglage fin et indépendant des conditions réactionnelles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Consommation énergétique élevée</li> <li>→ Faible économie d'atomes</li> </ul>	
⇒ Les deux catalyseurs sont utilisés de manière séquentielle dans deux compartiments réactionnels différents.			
<i>two-pots/one-step</i> (2P1S)	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Économie d'énergie</li> <li>→ Rendements élevés grâce à la mise en place de synergies (thermodynamique)</li> <li>→ Conditions réactionnelles différentes pour les deux catalyseurs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Complexité de mise en œuvre</li> <li>→ Problème de diffusion des réactifs entre les compartiments</li> </ul>	
⇒ Les deux catalyseurs sont dans deux compartiments séparés mais sont reliés l'un à l'autre et travaillent en parallèle.			
<i>one-pot/two-steps</i> (1P2S)	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Économie d'énergie</li> <li>→ Simplicité de mise en œuvre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Pas de déplacement d'équilibre réactionnel possible</li> <li>→ Action requise durant le procédé</li> <li>→ Temps de réaction plus long</li> </ul>	
⇒ À la fin de la réaction réalisée par un premier catalyseur, un second est ajouté dans le même milieu réactionnel pour effectuer la seconde étape catalytique.			
<i>one-pot/one-step</i> (1P1S)	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Économie d'énergie</li> <li>→ Rendements élevés grâce à la mise en place de synergies (thermodynamique)</li> <li>→ Unique jeu de conditions réactionnelles</li> <li>→ Grande simplicité de mise en œuvre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Flexibilité moindre</li> <li>→ Risque d'incompatibilité des catalyseurs</li> </ul>	
⇒ Les deux catalyseurs sont introduits dans le milieu réactionnel dès l'initiation de la réaction, et travaillent de manière séquentielle ou en parallèle.			

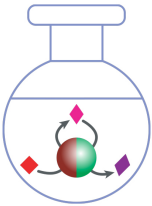
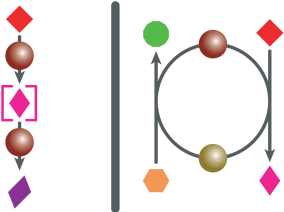


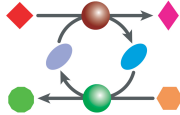
Matériaux multi-catalytiques (MMC)	→ Avantages des 1P1S avec une plus grande synergie entre les sites catalytiques et une plus grande facilité de mise en œuvre	→ Inconvénients des 1P1S	
⇒ Les différents centres catalytiques sont regroupés sur un même matériau afin de simplifier et d'optimiser la mise en œuvre de procédés en 1P1S.			

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents types de réactions multi-catalytiques impliqués dans des procédés en « one-pot/one-step ».

Type de réaction	Terminologies courantes en catalyse chimique	Terminologies courantes en biocatalyse	Schéma réactionnel
Domino/Cascade	Domino/Cascade (mécanisme identique) & Auto-tandem/Tandem assisté (mécanismes différents) <sup>98,105</sup>	Enzyme de fusion (plusieurs sites catalytiques) <sup>100</sup>	
⇒ Un seul catalyseur avec un ou plusieurs mécanismes catalytiques.			
Tandem combiné	Réaction coopérative <sup>108</sup>	Enzyme et cofacteur	
⇒ Deux catalyseurs agissant ensemble pour la transformation d'un seul substrat.			
Tandem séquentiel	Tandem orthogonal, <sup>98,105</sup> Cascade concurrente, <sup>103,104</sup> Réaction en relais (1P1S) <sup>108</sup>	Cascade linéaire <sup>100,107</sup>	
⇒ Deux catalyseurs fonctionnant successivement, le produit de l'un étant le substrat de l'autre.			
Tandem parallèle	Cascade coopérative, <sup>103,104</sup> Réaction en relais (1P1S) <sup>108</sup>	Cascade parallèle <sup>107</sup>	
⇒ Deux catalyseurs travaillant en parallèle, mettant en jeu un intermédiaire réactionnel qui est consommé par l'un puis régénéré par l'autre. Les deux couples de substrats n'interagissent pas entre eux.			



Tandem cyclique	Cascade coopérative, <sup>103,104</sup> Réaction en relai (1PIS) <sup>108</sup>	Cascade cyclique <sup>107</sup>	
⇒ Le second catalyseur régénère les substrats du premier à partir de l'un des produits formés par la première réaction.			
Tandem activé	Cascade séquentielle <sup>103,104</sup>	---	
⇒ Modification du milieu réactionnel par la première réaction catalytique, conduisant à l'activation du second catalyseur. Il s'agit d'une pseudo-1PIS, les deux catalyseurs n'étant pas actifs en même temps.			

### ***Les systèmes multi-catalytiques en chimie et biologie : abondance et limites***

Suite à l'établissement de la terminologie, nous pouvons réaliser un bref état de l'art des systèmes multi-catalytiques dans les domaines de la chimie et de la biologie afin de pouvoir identifier les verrous qu'il reste à lever pour les mettre au point de manière plus efficace. Comme précisé précédemment, le type de procédé le plus recherché en synthèse multi-catalytique est celui réalisé en 1PIS, pour les nombreux avantages qu'il offre sur le plan de la diversité réactionnelle et de la synergie entre catalyseurs.

Avant de continuer plus avant, je me permettrai d'ouvrir une parenthèse sur les raisons qui sont souvent invoquées pour justifier la mise au point de systèmes multi-catalytiques, car si elles sont justes, elles ne traduisent cependant pas selon moi la véritable valeur ajoutée de ce type de procédé. Il est ainsi presque systématiquement mis en avant que les procédés 1PIS sont très utiles pour la synthèse de composés asymétriques,<sup>126,127</sup> ces derniers possédant bien souvent une haute valeur ajoutée (cosmétique et pharmaceutique). Il est certes tout à fait vrai que ce type de procédé, quel que soit l'agencement réactionnel choisi (cascade, tandem, ou plus encore cyclique), offre la possibilité d'aboutir à l'introduction d'un ou plusieurs centres asymétriques en plus de nouvelles fonctions chimiques grâce au couplage d'un ou plusieurs catalyseurs stéréosélectifs. Mais il est important de ne pas négliger les réactions n'aboutissant pas sur des molécules chirales, souvent produites en faible quantité et chères, mais plutôt sur des produits de grande consommation ou de commodité (polymères, peintures, petites molécules à la base de l'industrie chimique, etc.). Ces exemples de réactions sont très peu cités pour justifier la mise en place de procédés 1PIS, or c'est justement par leur haute volumétrie qu'ils exploitent au mieux les avantages de ces derniers, en permettant de réduire les coûts en solvant (purification) et en énergie (chauffage) sur de plus larges échelles. Si ces avantages sont également intéressants pour les molécules à haute valeur ajoutée, leur importance est inversement proportionnelle à la valeur desdits composés : on se préoccupe moins de l'énergie utilisée pour la synthèse d'un anticancéreux très onéreux produit en quantité limitée, que de celle servant à la production de plastiques utilisés à l'échelle mondiale et vendus quelques euros la tonne. C'est en partie la raison pour laquelle j'ai choisi de plutôt développer de nouveaux procédés hybrides pour la valorisation de composés produits en grande quantité par les bioraffineries, et également de les appliquer à la synthèse de nouveaux polymères, utilisés dans de très larges proportions par tous les secteurs industriels.

Après lecture de la littérature sur le sujet il apparaît très clairement que les exemples de réalisation en 1P1S sont plus présents en biocatalyse qu'en catalyse chimique. Avec plus d'une dizaine de revues publiées rien qu'en 2019 traitant de l'élaboration de cascades enzymatiques, on ne compte en effet plus le nombre d'exemples de combinaisons enzymatiques, et la plupart sont réalisés au sein d'un même milieu réactionnel.<sup>101,128-131</sup> Les cascades enzymatiques deviennent alors presque incontournables lors de l'utilisation d'enzymes, notamment grâce à la régénération des cofacteurs et des cosubstrats qu'elles permettent, et sont à ce titre presque considérées comme des catalyseurs à part entière ayant leur propres propriétés et spectre de substrats. Certaines équipes de recherche se sont même spécialisées dans la production d'enzymes fusionnées afin de lier leurs activités.<sup>132</sup> Il s'agit à ce propos d'une des stratégies utilisées à l'heure actuelle pour la conception des matériaux multi-catalytiques. A l'inverse, cette tendance contraste avec ce qui est observé dans la littérature en catalyse chimique, pour lesquels l'utilisation d'un catalyseur unique par procédé est encore la règle dans la grande majorité des cas. Ceci est d'autant plus étonnant que la quasi-totalité des revues qui traitent des réactions multi-catalytiques en chimie décrit ce champ disciplinaire comme s'inspirant très largement des systèmes naturel (cascades enzymatiques, cellules),<sup>98,105,113,127,133-137</sup> voire que celui-ci en est directement issu selon certains auteur·rice·s.<sup>106</sup> Les systèmes biologiques sont en effet très souvent considérés comme à un stade d'optimisation particulièrement avancé et avec des degrés de complexité nettement supérieurs aux catalyseurs chimiques artificiels. On citera par exemple les *N-heterocyclic carbenes* (NHC) qui reprennent de manière simplifiée le mécanisme des enzymes de la famille des transcétolases, qui utilisent un NHC naturel, la thiamine pyrophosphate (TPP), comme cofacteur pour la création de liaisons carbone-carbone.<sup>113</sup> Cette inspiration s'exerce d'ailleurs probablement à juste titre dans la mesure où, contrairement aux catalyseurs chimiques, les biocatalyseurs ont été optimisés en vue de leur incorporation au sein de macro-systèmes catalytiques à travers leur longue évolution. La cellule vivante demeure sûrement le plus sophistiqué et le premier des systèmes multi-catalytiques en 1P1S jamais mis au point. Au sein de celle-ci se combinent des centaines de catalyseurs aux formes, mécanismes, propriétés physicochimiques et conditions réactionnelles différentes, interagissant en synergie grâce à la mise en place d'équilibres thermodynamiques finement régulés. Notons aussi que l'organisation cellulaire est une importante source d'inspiration pour la compartimentation des catalyseurs (2P1S). La cellule possède en effet déjà des organites différenciés internalisant chacun des familles de catalyseurs particuliers. À titre d'exemple, les mitochondries et les chloroplastes, qui sont les lieux spécialisés dans la génération de l'énergie cellulaire, déploient des systèmes parfaitement agencés de catalyseurs immobilisés permettant d'optimiser les échanges électroniques entre ces derniers. Il est d'ailleurs possible que cette complexité cellulaire sur le plan catalytique puisse expliquer pourquoi les chercheur·se·s en biocatalyse accordent une telle importance aux procédés multi-catalytiques dans leur recherche. Cette transposition du milieu naturel dans les procédés catalytiques artificiels, chimiques et biocatalytiques, justifie la nécessité d'une étroite collaboration entre chimistes et biologistes. De cette dernière naît d'ailleurs l'élaboration de systèmes innovants faisant ponts entre les deux disciplines, comme les peptides catalytiques et les enzymes artificielles qui incorporent des catalyseurs chimiques directement au sein de structures biologiques.<sup>120,138,139</sup>

Une des explications pouvant justifier l'absence de procédés multi-catalytiques chimiques pourrait provenir de la très importante diversité de catalyseurs, homogènes et hétérogènes, aujourd'hui à disposition des chimistes. Celui-ci est en effet sûrement supérieur à celui des enzymes en tout cas actuellement connues et utilisées. Une fois couplée à leur plage considérable de conditions opératoires, avec des gammes de pressions, de température et de solvants particulièrement étendues, on peut aisément comprendre pourquoi si peu de procédés font appel au couplage de plusieurs catalyseurs, d'autant que cette variété rend ce

couplage sous la forme de procédés 1P1S plus complexe. Aussi, là où, pour générer de la diversité en biocatalyse, une approche combinatoire s'est rapidement imposée compte tenu du fait que les outils permettant de créer ou rechercher de nouvelles enzymes ne sont apparus que récemment, les chimistes, eux, ont très tôt pu profiter des nombreux éléments du tableau périodique et en particulier des métaux de transition, mais aussi de la grande variété de structures et assemblages qu'il est possible de créer avec ceux-ci. Le besoin de combiner deux catalyseurs n'en est que moins criant, et bon nombre de procédés industriels actuellement en opération trouvent leur efficacité dans l'utilisation d'un catalyseur chimique bien optimisé.<sup>98</sup> À cette première constatation vient s'ajouter le fait que les catalyseurs chimiques présentent bien souvent des structures assez simples, en tout cas comparé à celles des systèmes catalytiques issus du vivant, ne permettant pas de protéger les sites catalytiques contre l'inhibition créée par d'autres espèces comme les substrats et produits de réaction parallèles, ou encore contre d'autres catalyseurs. Il n'est alors pas rare que des réactions secondaires d'empoisonnement, de désactivation, parasites, ou de dimérisation apparaissent lors de la combinaison de deux catalyseurs chimiques.<sup>98</sup>

Pour répondre à ces difficultés, et exploiter la diversité des catalyseurs chimiques au travers de systèmes multi-catalytiques, les chimistes font appel à l'utilisation de nombreuses techniques de compartimentation et d'immobilisation. De cette stratégie est né le domaine de la catalyse hétérogène, aujourd'hui très largement exploré, et qui permet aux chimistes de mettre au point des procédés très efficaces avec la possibilité de recycler facilement les catalyseurs entre deux cycles. On peut ainsi classer les matériaux catalytiques hétérogènes en trois grandes familles selon leur type.<sup>105</sup> Ces familles et les matériaux qui les composent sont résumées dans la Figure 49 ci-dessous et leurs caractéristiques principales sont présentées en détail dans la revue associée.

Matériaux chémo-catalytiques	Organiques	Polymères catalytiques organiques (dendrimères, etc.)
		Etc.
	Inorganiques	Nanoparticules métalliques sur supports inorganiques (zéolites, silices, etc.)
		Nanoflowers métalliques
		Nanocomposites inorganiques (nanocubes métalliques)
		Oxohydroxides de métaux (MO/MOOH)
		Hydroxydes Double Lamellaires (HDL)
		Etc.
	Combinés (Organiques/Inorganiques)	Nanoparticules métalliques sur supports organiques (polystyrènes, cyclodextrines, etc.)
		Catalyseurs organiques adsorbés sur supports inorganiques (silice, carbone, etc.)
		Catalyseurs organiques liés de manière covalente à des supports inorganiques
		Nanoparticules métalliques sur Metal-Organic Frameworks (MOFs)
		Nanoparticules métalliques sur Covalent Organic Frameworks (COFs)
		Etc.

Figure 49 : Aperçu des différentes familles de matériaux chémo-catalytiques ainsi que des principaux matériaux qu'elles regroupent.

La presque totalité des matériaux ici listés a déjà servi à la conception de systèmes multi-catalytiques, avec plus ou moins de succès suivant les avantages et inconvénients qui leur sont inhérents que cela soit sur le plan de leur synthèse en elle-même que sur celui de leur mise en œuvre. Ces derniers sont résumés dans le Tableau 4.<sup>105</sup> Ainsi, on peut globalement regrouper les matériaux multi-catalytiques chimiques selon les 3 grandes familles suivantes : les matériaux présentant de manière concomitante des sites acides et basiques Brønsted comme les MOOH.<sup>105,140</sup> Vient ensuite la combinaison d'acides de Lewis avec des acides de Brønsted avec, par exemple, la modification de zéolites par substitution isomorphique de certains atomes de silice par des ions métalliques tri- ou tétravalents.<sup>105,140,141</sup> De manière plus générale, ce type de matériaux est souvent constitué à partir de silice ou de silicates d'aluminium. À l'inverse, on trouvera les associations métal-bases de Brønsted, souvent sous la forme de nanoparticules métalliques ou d'HDL. En exemple on pourra citer les catalyseurs de type métal-amide, permettant de réaliser la formation de liaisons carbone-carbone selon différents types de réactions.<sup>142</sup> Aussi, il est clair que les sites actifs catalytiques les plus communs en chimie sont les sites acides, basiques et métalliques, et ces catalyseurs permettront globalement de respectivement catalyser des réactions de déshydratation/hydrolyse/isomérisation, de condensation, et d'hydrogénation/déshydrogénation/oxydation. Notons que les revues générales de Jagadeesan *et coll.* (2016) et de Climent *et coll.* (2014) font autorité en ce qui concerne les différentes possibilités en termes de matériaux multi-catalytiques chimiques.<sup>105,134</sup>

Tableau 4 : Liste non exhaustive mais représentative d'avantages et inconvénients d'une sélection de catalyseurs chimiques supportés.

Type de catalyseur	Avantages	Inconvénients
Polymères catalytiques organiques	Stabilité colloïdale, activités élevées	Faible stabilité face à l'attaque chimique, contrôle difficile de l'agencement des sites catalytiques
Nanoparticules métalliques sur supports inorganiques	Stabilité thermique élevée, très bonne séparation	Sélectivité faible, fragilité mécanique
<i>Nanoflowers</i>	Surface spécifique très élevée, bonne séparation	Fragiles pour les applications industrielles
Nanocomposites inorganiques	Design rationnel possible, nombreuses propriétés non catalytiques additionnelles	Matériaux fragiles suivant leur composition
Oxohydroxydes de métaux	Synthèse aisée, bonne séparation	Activité assez faible
Hydroxydes Doubles Lamellaires	Synthèse aisée, grande compatibilité avec les métaux	Fragilité en solution
Nanoparticules métalliques sur supports organiques	Stabilité colloïdale	Relargage élevé, synthèses difficiles
Catalyseurs organiques adsorbés sur supports inorganiques	Activités élevées, meilleure séparation	Relargage élevé
Catalyseurs organiques liés sur supports inorganiques	Faible relargage, synthèse rationnelle possible, meilleure séparation	Activité plus faible
<i>Metal-Organic Frameworks</i>	Contrôle très fin des centres catalytiques, grande versatilité de structures, bonne séparation	Fragilité face à l'hydrolyse aux pH extrêmes et hautes températures
<i>Covalent-Organic Frameworks</i>	Stabilité accrue, synthèse moins couteuse	Flexibilité structurale moins importante

(Tableau inspiré de Jagadeesan *et coll.*)<sup>105</sup>

Pour résumer les différences et similitudes qui régissent la création et l'utilisation de matériaux multi-catalytiques en biologie et en chimie, nous pouvons commencer par statuer sur le fait que nous avons d'un

côté le domaine de la biocatalyse enzymatique dans lequel le nombre de procédés 1P1S est désormais très important, mais qui peine à transférer ses procédés catalytiques vers le domaine industriel du fait de la grande fragilité des catalyseurs qu'il met en jeu ; et, d'un autre côté, nous avons la chémocatalyse qui propose déjà une importante diversité de catalyseurs unitaires, mais qui, par cette diversité peine à mettre en place des procédés en 1P1S, notamment à cause d'une inhibition croisée entre les sites catalytiques. Notons aussi que les deux domaines voient en la compartimentation des catalyseurs, et plus particulièrement la création de matériaux regroupant plusieurs sites catalytiques distincts et agencés de manière rationnelle, une bonne solution pour permettre de lever ces verrous. Il apparaît alors évident qu'associer ces deux types de catalyse au sein d'un même matériau pourrait représenter une solution viable pour la mise en place de procédés 1P1S plus efficaces et plus diversifiés.<sup>143</sup> Ce concept visant à combiner simultanément un catalyseur chimique et un biocatalyseur selon un procédé 1P1S peut être décrit à l'aide de différentes terminologies, telle que « catalyse chemo-biologique », mais il semble que celle de « catalyse hybride » tende doucement à s'imposer, car cette dernière traduisant peut-être mieux l'inter-coopération de ces deux espèces catalytiques très différentes.

### Les différentes nuances de catalyse hybride

Terminons cette partie introductive avec un bref aperçu des différentes familles de procédés hybrides (Figure 50) et de leur évolution en nombre. Comme pour les réactions multi-catalytiques en catalyse chimique et biologique, la catalyse hybride peut également être classée selon les types de procédés réactionnels décrits précédemment (*nPnS*). Aussi, de la même façon que nous l'avons évoqué lors du passage sur les tandems catalytiques, la catalyse hybride peut être mise au profit de différents objectifs.

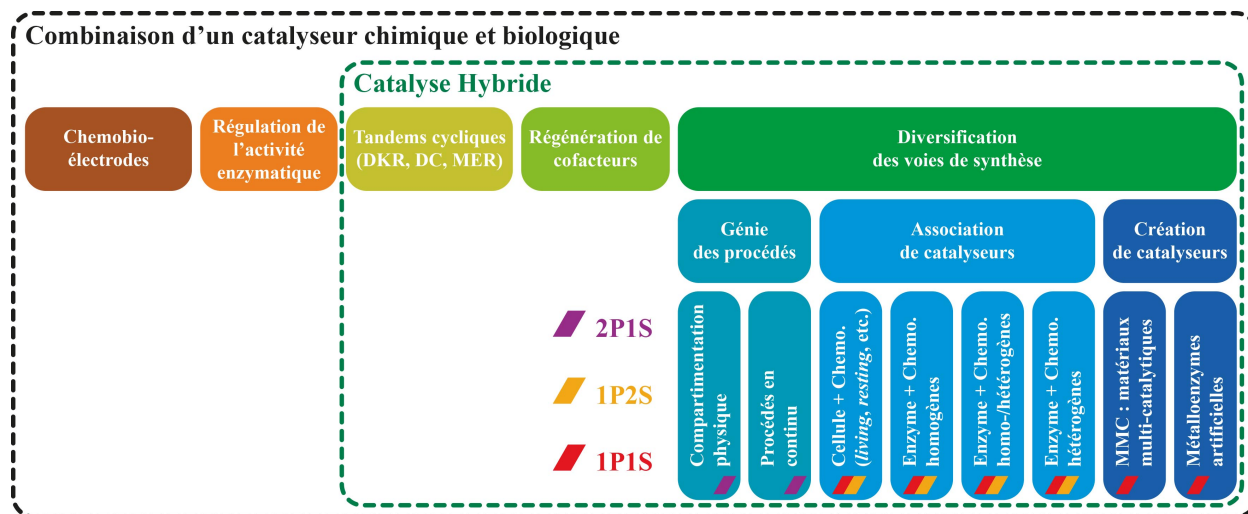


Figure 50 : Différentes approches et objectifs pour la combinaison d'un catalyseur chimique et d'un catalyseur biologique.

(DKR = *dynamic kinetic resolution*, DC = *déracémisation cyclique*, MER = *minor enantiomer recycling*)

Commençons cependant par écarter deux types de combinaisons de catalyseurs chimique et biologique qui ne font selon moi pas partie de la catalyse hybride : la production de chemobioélectrodes,<sup>144-151</sup> et l'utilisation d'espèces chimiques pour la régulation de l'activité d'enzymes. La première thématique n'a en effet pas pour objectif la transformation de molécules, celle-ci représentant plutôt une étape intermédiaire du processus permettant la détection d'une espèce chimique dans le cas de la synthèse de chemobiosenseurs,<sup>152,153</sup> plutôt qu'une fin en soi. Il convient de préciser qu'elle représente cependant une

part très importante des exemples de couplage des deux types de catalyseurs, notamment parce qu'elle inclue tout le champ disciplinaire de la production des biopiles.<sup>154,155</sup> De la même façon, des catalyseurs chimiques, comme des nanoparticules de platine ont déjà été couplées au site actif de plusieurs familles d'enzymes afin d'améliorer leur activité.<sup>156,157</sup> Cependant, dans ces exemples, le catalyseur chimique ne réalise pas de transformation chimique, et est utilisé à la place pour augmenter la température à l'intérieur du site actif de l'enzyme, ou pour activer ce dernier par transfert d'énergie ou effets électronique, après une excitation en présence d'une source lumineuse. Il n'en reste pas moins que si on ne peut pas réellement considérer ces exemples comme de la catalyse hybride, ils représentent une voie prometteuse pour l'amélioration des procédés biocatalytiques. Viennent alors les métalloenzymes artificielles,<sup>103,138,158-160,120,139</sup> qui sont sûrement à l'extrême limite de la catalyse hybride, situées entre celle-ci et les exemples précédents. Nombre de métalloenzymes n'arborent en effet qu'un seul centre catalytique, le centre métallique,<sup>161,162</sup> la partie protéique étant utilisée comme squelette pour apporter différentes propriétés supplémentaires comme la sélectivité qui est souvent limitée. Néanmoins, il existe tout de même plusieurs exemples de métalloenzymes multi-catalytiques,<sup>163-166</sup> lesquelles font alors directement partie de la catalyse hybride. J'ajoute que la terminologie « métalloenzyme » a à plusieurs reprises été utilisée pour décrire la co-immobilisation d'une enzyme et d'un catalyseur chimique sur un même matériau,<sup>138,167,168</sup> mais il me semble qu'il s'agit là d'une utilisation galvaudée de celle-ci, le terme de métalloenzyme devant selon moi être réservé à la description de catalyseurs utilisant directement la chaîne peptidique comme support (pour le site actif de l'enzyme et pour le catalyseur chimique).

Si l'on se concentre à présent sur les différentes familles de procédés hybrides utilisés en synthèse, nous pourrions commencer par citer les tandems cycliques (DKR, DC et MER) que nous avons mentionné précédemment.<sup>124,169-173</sup> Le but n'est certes pas vraiment l'ajout de plusieurs nouvelles fonctions chimiques selon une cascade réactionnelle, la DKR ne produisant d'ailleurs aucun nouveau produit, mais ce type de couplage représente l'une des plus anciennes utilisations de la catalyse hybride, et il est resté jusqu'il y a peu celui qui était très largement le plus répandu. En réalité, jusqu'aux années 2010, on comptait moins d'une quinzaine d'exemples de catalyse hybride pour la synthèse de nouveaux composés, la combinaison de catalyseurs chimiques et biologiques se résumant presque exclusivement à des réactions de DKR et dérivés. Parmi les groupes ayant intensément travaillé sur cette thématique, il convient de citer l'équipe de Bäckvall qui est l'une des équipes les plus productives dans le domaine de la catalyse hybride. Bäckvall a pour ainsi dire contribué à faire émerger la catalyse hybride dans le monde de la recherche en catalyse, avec la mise au point de systèmes comme récemment la mise au point de matériaux multi-catalytiques hybrides permettant de réaliser des DKR ou des synthèses en tandem.<sup>168,174</sup> Ainsi, les DKR ont ouvert la voie à la combinaison de catalyseurs chimiques et biologiques, et aux autres types de combinaison qu'il est aujourd'hui possible d'envisager.

Vient ensuite la régénération des cosubstrats (« cofacteurs ») coûteux utilisés en biocatalyse comme le NADH et le FADH<sub>2</sub>. Ce domaine de recherche, dont les premiers exemples remontent à 1990, est particulièrement intéressant et connaît une expansion rapide depuis quelques années.<sup>160,175-177</sup> Il est ainsi notamment possible d'utiliser des complexes phénantrolines de métaux de transition (iridium, rhodium, ruthénium et même Co) pour la conversion de NAD en NADH et inversement.<sup>178-181</sup> La combinaison de ce type de catalyseur a déjà été mise en œuvre avec succès pour différentes familles d'enzymes dépendantes du NADH,<sup>182</sup> principalement des alcool déshydrogénases,<sup>183-189</sup> ainsi que d'autres familles d'oxydoréductases.<sup>190-193</sup> Le Pr. Franck Dumeignil (UCCS) a d'ailleurs récemment proposé le couplage de ce type de complexe organométallique avec une sorbitol déshydrogénase, pour la production de fructose à

partir de sorbitol, sous la forme d'un tandem parallèle générant du dihydrogène (Figure 51).<sup>143,194</sup> Ce dernier peut d'ailleurs être utilisé pour la production du sorbitol à partir de glucose biosourcé par hydrogénation.

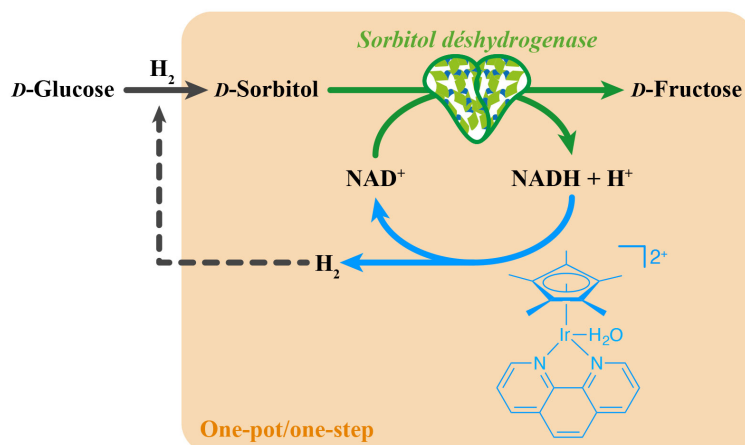


Figure 51 : Couplage d'une sorbitol déshydrogénase avec un complexe organométallique à l'iridium pour la conversion de *D*-sorbitol en *D*-fructose selon un procédé hybride générant du dihydrogène.

Il est également possible d'utiliser d'autres types de catalyseurs chimiques, comme des nanoparticules de platine,<sup>176,195</sup> des groupements porphyrines couplés à du fer,<sup>196</sup> ou encore des nanotubes de carbone fonctionnalisés.<sup>183</sup> Concernant la source de protons et d'électrons nécessaire à la régénération du catalyseur chimique, plusieurs approches ont été proposées, impliquant de l'électro- ou de la photocatalyse,<sup>193,195,197</sup> l'utilisation de formate, selon un système similaire à celui entièrement biocatalytique reposant sur la formate déshydrogénase,<sup>185,186,188,189,192</sup> ou encore par consommation ou libération de dihydrogène comme dans le cas de l'exemple cité juste au-dessus.<sup>176,194</sup> A ce propos, l'un des systèmes qui est sûrement le plus abouti à l'heure actuelle pour la régénération hybride de  $NADH$  est celui proposé par la société HydRegen, fondée par la Pr. Kylie Vincent et son groupe. Celui-ci combine des nanoparticules de palladium immobilisées sur du carbone, en association avec une  $NAD^+$  réductase, et utilise également du  $H_2$  comme donneur de protons et d'électrons.<sup>198</sup> Ses électrons sont en effet captés par les nanoparticules, pour être transmis au support en carbone, lequel les transmet à son tour à l'enzyme. Cette dernière utilise également les protons générés lors de l'oxydation du  $H_2$  par les nanoparticules pour convertir le  $NAD^+$  en  $NADH$ . Le gros avantage de cette méthode est qu'elle combine à la fois l'utilisation d'une source de protons et d'électron particulièrement intéressante pour la décarbonation de l'industrie, l'hydrogène pouvant être produit par différentes approches dont l'électrolyse de l'eau, avec une régénération enzymatique du  $NADH$ , ce qui évite la formation d'isomère inactifs de ce dernier (*1,2*-dihydro $NAD$  et *1,6*-dihydro $NAD$ ). La formation de ce dernier est en effet l'une des principales limitations à l'utilisation directe de catalyseurs chimiques pour la régénération, lesquels produisent généralement de nombreux sous-produits par manque de sélectivité. Précisons que ce concept a depuis été adapté en flux continu, démontrant son intérêt pour le développement de futur procédés industriels.<sup>199</sup>

Viennent enfin la conception de procédés pour la synthèse de nouveaux composés selon des tandems séquentiels, sous la forme de 1P2S ou 1P1S. On laissera volontairement de côté les 2P1S qui font plutôt partie du génie des procédés que du couplage direct de catalyseurs. Ce type de couplage n'est cependant à ne pas négliger dans la mesure où il permet bien souvent de contourner efficacement les empoisonnements des catalyseurs entre eux, et il a conduit à des procédés hybrides très efficaces.<sup>200-205</sup> Nous avons nous-même également bénéficié des avantages que les 2P1S proposent en catalyse hybride pour mettre au point

un procédé de production du 5-hydroxyméthylfurfural à partir du glucose, que je détaillerai ci-après.<sup>206</sup> Si l'on se concentre donc sur les 1P2S et 1P1S qui représentent à mon sens le cœur de la catalyse hybride, de par leur niveau d'intégration supérieur, il est intéressant de constater que, bien qu'il ne s'agisse pas du type de combinaison le plus simple, le premier exemple de procédé hybride répertorié est un système en 1P1S impliquant un catalyseur hétérogène inorganique avec une enzyme en 1980. Makkee *et coll.* sont en effet les premiers à combiner une glucose isomérase avec du Pt/C pour la conversion efficace du *D*-glucose en *D*-mannitol.<sup>207</sup> L'enzyme est alors chargée d'isomériser le glucose en fructose, lequel est alors hydrogéné en mannitol à l'aide du métal. De manière particulièrement intéressante, il s'agit aussi du tout premier exemple de 1P1S, les deux catalyseurs étant utilisés en tandem en solution. Pour permettre à l'enzyme de fonctionner dans ces conditions réactionnelles, les auteurs l'avaient immobilisée dans de la gélatine, et interconnectée avec du glutaraldéhyde (« *cross-linked enzymes aggregate* », CLEA). Les auteurs testèrent de la même manière une large variété de métaux de transition (Ni, Ru, Rh, Ir, Pd) et constatèrent que le ruthénium était aussi utilisable quoique plus rapidement désactivé par l'enzyme. Suite à ce premier succès, il fallut attendre malgré tout le début des années 2000 pour voir un autre exemple de catalyse hybride qui ne soit pas de la DKR. En 2003, Schoevaert *et coll.* décrivent en effet l'association entre la *L*-proline, comme catalyseur organique homogène, et une *D*-galactose oxydase pour effectuer la synthèse de dérivés de 4-désoxy-*D*-glucose à partir de *D*-galactose selon un procédé de type one-pot/three-steps.<sup>208</sup> Un an plus tard, Edin *et coll.* décrivent la synthèse d'aldols acétylés énantiomériquement purs en combinant une aldolisation avec une acétylation, catalysées respectivement par la *L*-proline et une lipase.<sup>209</sup> Notons, qu'à la suite des travaux de Makkee *et coll.* il fallut attendre 2005 avant de voir apparaître un nouvel exemple de 1P1S,<sup>210</sup> et 2007 pour de nouveau avoir la combinaison de deux catalyseurs hétérogènes.<sup>211</sup> Pour ainsi dire, on ne dénombre au total que 9 exemples de catalyse hybride en 1P2S avant les années 2010, et seulement 6 en 1P1S (Figure 52). On comprend alors mieux pourquoi ce domaine de recherche en est encore à ses débuts, et pourquoi il représente un si grand intérêt. Bien qu'encore assez restreint, le nombre d'études décrivant l'association d'un catalyseur chimique et d'un biocatalyseur a augmenté de manière importante durant les 10 dernières années, et la variété des nouveaux composés chimiques accessibles s'en est ainsi retrouvée exponentiellement élargie.<sup>99,103,137,212–222</sup>

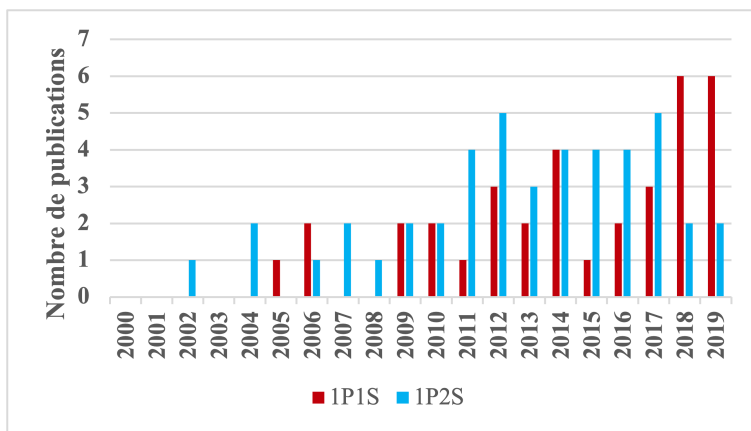


Figure 52 : Nombre de publications décrivant des réactions en catalyse hybride selon un procédé 1P1S (rouge) et 1P2S (bleu) entre les années 2000 et 2019.

On assiste d'ailleurs à une augmentation exponentielle du nombre d'études rapportant des systèmes hybride depuis les années 2020, avec plus d'une trentaine d'études rien qu'en 2022 si l'on combine les 1P1S, 1P2S et 2P1S. Certaines de ces récentes études mettent d'ailleurs à l'honneur des familles d'enzymes



qui n'étaient jusque-là, contrairement aux lipases/estérase et certaines oxydases (horsradish peroxydase (HRP), glucose oxydase (GOx), monooxygénases, etc.), que peu répertoriées en catalyse hybride :<sup>213,223</sup> alcool et amino acid dehydrogenases,<sup>213,224</sup> amino acid oxydases,<sup>225</sup> cétone reductases,<sup>226-228</sup> , des transaminases,<sup>224,229-232</sup> ou encore des halogénases,<sup>204,233</sup> et des aldolases très récemment.<sup>234</sup> On pourra citer à titre d'exemple, et pour terminer, la très diverse série d'articles publiés par He *et coll.*, lesquels ont su exploiter la diversité de réactions proposées par les enzymes pour proposer un concept général de synthèse hybride de dérivés du furfural.<sup>230,235-250</sup> Celui-ci s'appuie sur la dépolymérisation acide d'un panel de sources de biomasse (rafle de maïs, paille de riz, tige de sorghum, coquille de marron et même carapace de crevette, etc.) pour produire du *D*-xylose, lequel est alors déshydraté en furfural à l'aide d'un catalyseur à l'étain (principalement SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/SnO<sub>2</sub>) à haute température. Un fois le milieu réactionnel refroidi, une enzyme est ajoutée, sous forme libre ou sous forme de cellules entières, pour fonctionnaliser le furfural en un panel de dérivés (acide furoïque, furfurylamine, furfurylalcool), complétant ce procédé en 1P3S. Ce concept a depuis été étendu à d'autres dérivés de la biomasse comme le *D*-fructose, pour la production de 5-hydroxyméthylfurfural et de ses dérivés (5-hydroxyméthyl-2-aminométhylfurane, acide furan-2,5-dicarboxylic acid, furan-2,5-diylldimethanol).<sup>251-253</sup> Si l'on peut critiquer la tendance de ce groupe de recherche à démultiplier le nombre de publications n'ayant comme différence entre elles que le changement d'un ou deux paramètres du système à la fois (source de biomasse, variation de support pour le catalyseur chimique ou de la phase active, enzyme, solvants pour les différentes étapes, etc.), il faut tout de même reconnaître que les auteur·rice·s ont joliment modulé l'ensemble des possibilités que celui-ci offre, proposant au final une étude presque systématique et allant jusqu'à optimiser leur procédé pour la production de certains dérivés à haute concentration (500 mM). Ces travaux sont un bel exemple de la diversité qu'il est possible de générer au niveau des voies de synthèse une fois que l'on parvient à trouver une méthode de combinaison hybride suffisamment universelle que pour pouvoir faire varier tous ces paramètres. Je profiterai également de cet exemple pour souligner le fait que, comme les auteur·rice·s ont pu le démontrer, la catalyse hybride n'implique pas forcément l'utilisation d'enzymes isolées, mais qu'elle peut au contraire largement bénéficier de l'utilisation de cellules de microorganismes quel que soit leur état (*whole cells*, *resting cells*, *living cells*, voir même fermentation hybride) comme d'autres groupes ont également pu le démontrer.<sup>141,254,255</sup>

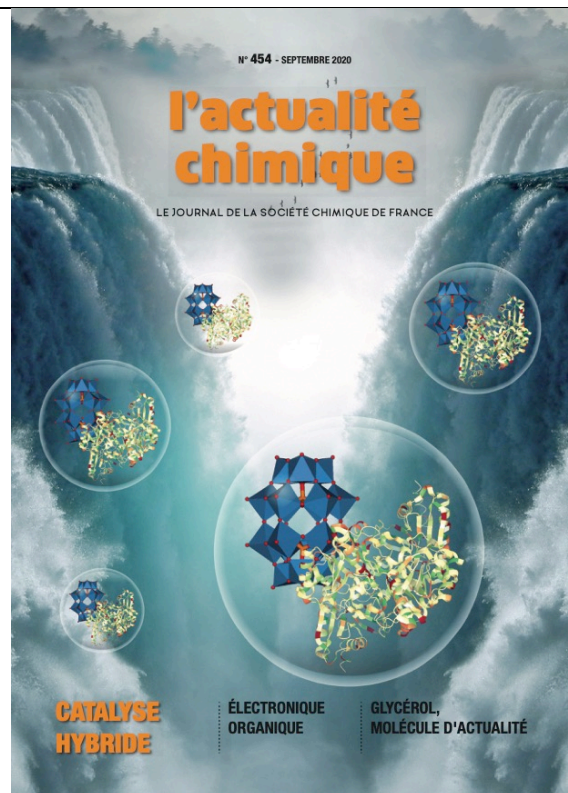
Ici s'achève cette partie introductive sur la catalyse hybride. Pour plus de précisions sur les différents concepts qui la régissent, ainsi qu'un panel plus détaillé d'exemples, je vous invite à consulter nos récentes publications dans *Catalysis Science and Technology* ainsi que dans l'Actualité Chimique,<sup>256-260</sup> parus en 2020. De la même manière, pour une vision plus orientée vers la valorisation de la biomasse des exemples en catalyse hybride, je joindrai également un chapitre dédié paru en 2021 dans le livre *Biorefinery: From Biomass to Chemicals and Fuels*.<sup>261</sup>

## L'Actualité Chimique

Septembre 2020

### Couverture

La catalyse hybride, qui combine catalyseurs chimiques et biocatalyseurs dans des tandems catalytiques intégrés, est une approche interdisciplinaire particulièrement prometteuse pour la réalisation de cascades catalytiques innovantes permettant l'obtention de nouveaux composés chimiques.



## Catalysis Science & Technology

Novembre 2020

### 4<sup>ème</sup> de Couverture

Intimate integration of biological and chemical catalysts has only recently emerged. The first examples of “Hybrid catalysis” can be found in the literature from the early 2000’s. Since that, the number of studies has progressively increased, but is still modest compared to the quantity of processes that involve one single type of catalyst. This is mainly due to the difficulty for biologists and chemists to communicate and bring together the skills involved in such sophisticated combinations. In this paper, we show and sort the advantages of the catalytic systems and of their variants of integration so as to pave the way for better rationalized development.



Showcasing research from Dr. Egon Heuson, BioEcoAgro, and Professor Franck Dumeignil, Unité de Catalyse et Chimie du Solide (UCCS), University of Lille, Nord, France.

The various levels of integration of chemo- and bio-catalysis towards hybrid catalysis

Intimate integration of biological and chemical catalysts has only recently emerged. The first examples of “hybrid catalysis” can be found in the literature from the early 2000’s. Since that, the number of studies has progressively increased, but is still modest compared to the quantity of processes that involve one single type of catalyst. This is mainly due to the difficulty for biologists and chemists to communicate and bring together the skills involved in such sophisticated combinations. In this paper, we show and sort the advantages of the catalytic systems and of their variants of integration so as to pave the way for better rationalized development.

As featured in:



See Egon Heuson and Franck Dumeignil, Catal. Sci. Technol., 2020, 10, 7082.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

rsc.li/catalysis  
Registered charity number: 207890

### Thématique 3.1 : synthèse de dérivés du furfural biosourcés par combinaison d'enzymes et de catalyseurs chimiques

Inspiré par l'incroyable diversité proposée par la catalyse hybride, en particulier pour la valorisation de composés biosourcés, je me suis intéressé à développer de nouveaux systèmes pour la réalisation de tandems catalytiques impliquant les enzymes que j'étudie et divers types de catalyseurs chimiques. Ces travaux s'inscrivent dans la continuité des thématiques menées à l'UCCS par le Pr. Franck Dumeignil que j'ai déjà mentionnées, et le Dr. Robert Wojcieszak, qui travaille pour sa part sur les réactions de déracémisation en 1P1S, mais également dans celle portée par le Pr. Rénato Froidevaux (UMRT BioEcoAgro), qui s'intéresse plus particulièrement au développement de systèmes en 2P1S.

#### *Synthèse du 5-hydroxyméthylfurfural directement à partir de glucose selon un procédé hybride en two-pots/one-step*

C'est d'ailleurs dans le cadre de cette dernière que j'ai participé à mon tout premier projet en catalyse hybride, visant la synthèse du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) à partir de *D*-glucose. Ce développement a été réalisé à travers la thèse d'Alexandra Gimbernat, financée par la plateforme REALCAT. Le HMF est en effet une molécule plateforme issue l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique qui suscite un très fort intérêt en ce moment car sa fonctionnalisation conduit à l'obtention d'une large variété de molécules ayant de nombreuses applications industrielles (Figure 53). On peut citer par exemple la production de monomères impliqués dans synthèse de polymères biosourcés comme le polyéthylène 2,5-furandicarboxylate (PEF) qui est issu de la polycondensation de l'acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA) et de l'éthylène glycol.

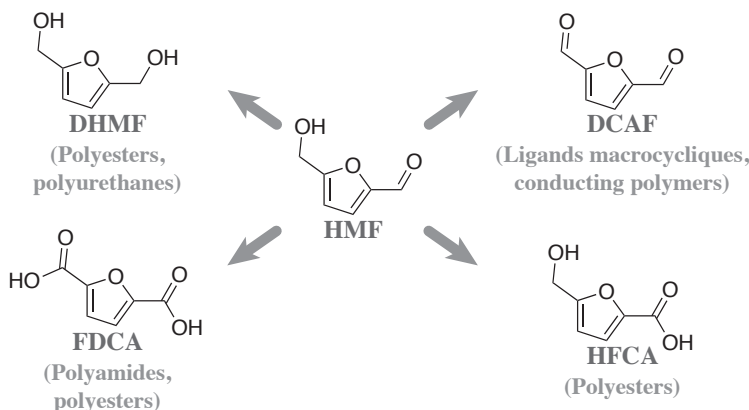


Figure 53 : Exemple de précurseurs de polymères obtenus à partir du HMF.

(DHMF : dihydroxyméthylfurfural ; DCAF : 2,5-dicarbaldéhydefurane ; FDCA : acide 2,5-furandicarboxylique ; HFCA : acide 5-(hydroxyméthyl)furan-2-carboxylique)

Or, l'obtention du HMF avec des rendements et des puretés élevées nécessaires à sa viabilité industrielle n'est pas chose aisée. Cette étude, réalisée conjointement entre l'UMRT BioEcoAgro, l'UCCS et l'IFPEN (Institut Français du Pétrole Énergies Nouvelles), s'est ainsi concentrée sur l'élaboration d'une nouvelle voie catalytique hybride basée sur un procédé en 2P1S pour la production efficace de HMF à partir du *D*-glucose dans un réacteur compartimenté triphasique. Notre nouvelle méthodologie part du *D*-glucose pour produire le *D*-fructose à l'aide d'une glucose isomérase immobilisée (Sweetzyme®IT extra) dans un premier réacteur, le *D*-fructose étant ensuite converti en HMF par catalyse acide à l'aide d'une résine sulfonique

dans un second réacteur. Les deux catalyseurs n'étant pas compatibles, la glucose isomérase étant dénaturée aux *pH* acides, et ces derniers étant tous deux opérés en solution aqueuse, il a été choisi d'adopter pour une stratégie basée sur deux compartiments isolés, reliés par une membrane liquide organique offrant libre circulation au *D*-fructose entre ces derniers (Figure 54).

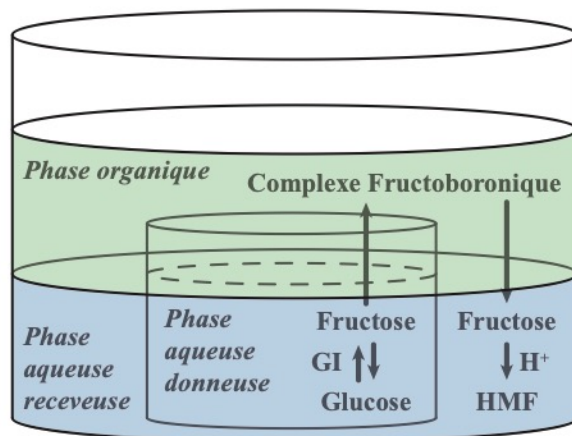


Figure 54 : Procédé bi-compartiment tri-phasique permettant la production d'HMF à partir de glucose à travers un système catalytique hybride basé sur l'utilisation d'une glucose isomérase (GI) immobilisée et d'une résine sulfonique ( $H^+$ ).

Après plusieurs essais, la 4-méthyl-2-pentanone (MIBK) a été retenue comme meilleur solvant pour notre membrane liquide, une fois cette dernière supplémentée avec un acide boronique (3,4-DCPBA) et un agent de transfert de phase (Aliquat336) chargés d'aider à la solubilisation du fructose en milieu organique. Avec ce système, si le taux d'isomérisation du glucose en fructose a pu être augmenté de 50 % ( $K_{eq} \sim 1$ ) à 70 %, étape limitante pour ce procédé, la concentration finale en HMF obtenue est restée très faible (4 %), notamment à cause d'un problème d'homogénéisation générale du système par manque d'agitation de la phase organique. Un système triphasique biréacteurs a alors été conçu (Figure 55). Cependant, le pont permettant les échanges de phase organique entre les deux réacteurs étant assez étroit, un souci similaire d'homogénéisation a aussi été observé dans un premier temps avec ce nouveau concept, et ce malgré un système d'agitation par pales indépendant dans chaque réacteur.

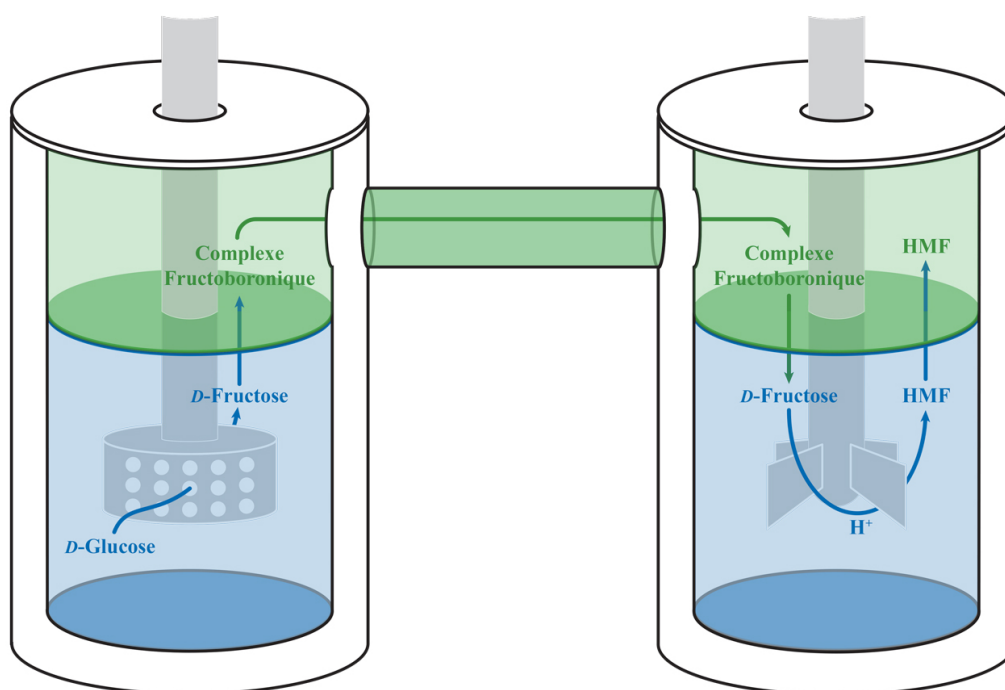
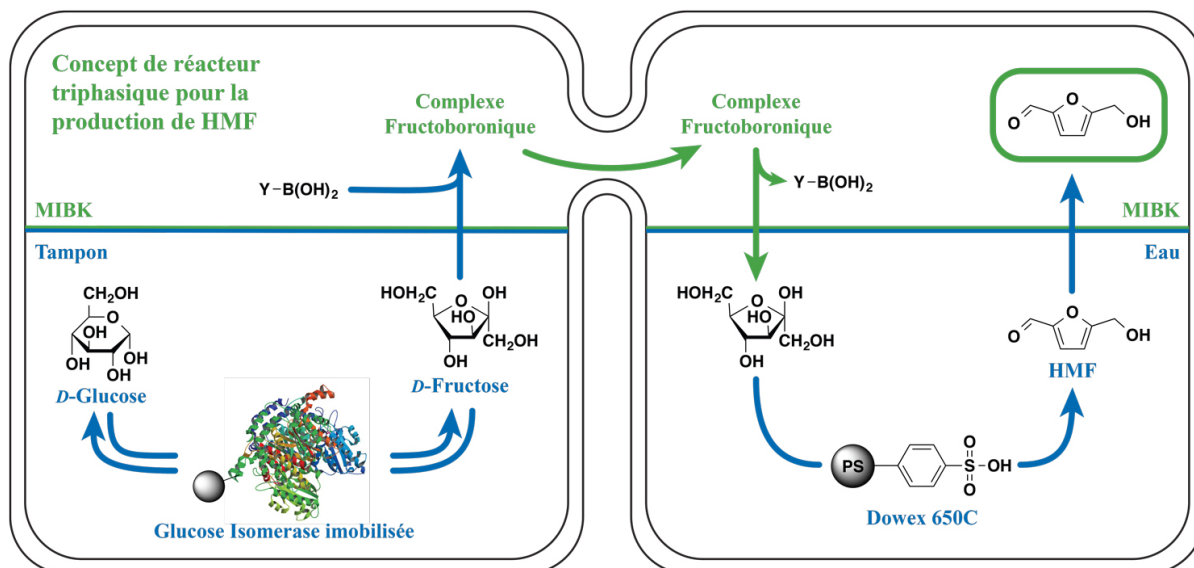


Figure 55 : Schéma du réacteur triphasique visant la conversion de glucose en HMF par un procédé *two-pots/one-step*.

Afin de résoudre ce problème, j'ai proposé la conception et la réalisation d'une pale spécifique pour ce système (Figure 56), cette dernière ayant été ensuite installée entre les deux compartiments au niveau du pont afin de casser l'effet vortex présent dans chaque réacteur et de forcer la phase organique à circuler d'un réacteur à l'autre.

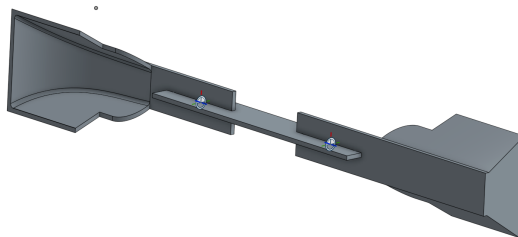


Figure 56 : Rendu 3D de la pale conçue pour le réacteur triphasique visant la conversion de glucose en HMF par un procédé 2P1S.

Grâce à cette pale, il a été possible d'obtenir un taux d'isomérisation encore supérieur, proche des 80 %, ainsi qu'un rendement final de 31 % en HMF, rendant ainsi ce procédé viable pour la synthèse de cet important composé. Ces travaux ont été publiés le journal *Catalysts* en 2018,<sup>206</sup> et le développement du nouveau réacteur avec la pale d'homogénéisation, ainsi que l'optimisation des conditions réactionnelles des deux catalyses, font l'objet d'une seconde publication qui a été soumise en Juillet 2023. Le système de pale intégré au réacteur a également fait l'objet d'un brevet en 2019 (*FR3077221*). Il s'agit là d'un des tous premiers exemples de catalyse hybride permettant de synthétiser le HMF à partir de *D*-glucose. Cette réussite démontre parfaitement l'intercomplémentarité existant entre la biocatalyse et la chémocatalyse, et plus largement entre l'UMRT BioEcoAgro et l'UCCS, et plus particulièrement dans le domaine du génie des procédés.

***Synthèse de furfurylamines par catalyse hybride : conversion du 5-hydroxyméthylfurfural en acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique selon un procédé en one-pot/two-steps***

En parallèle de ce premier projet, j'ai commencé à proposer plusieurs nouveaux concepts de procédés hybrides basés sur l'utilisation des familles d'enzymes que j'avais en ma possession, décrite dans les deux premiers axes de ce document. Compte-tenu de l'importance de la valorisation du HMF et de son haut degré de fonctionnalisation offrant accès de nombreuses voies de modification chimique, j'ai choisi cette molécule comme modèle pour la mise au point de premières combinaisons enzymes/nanoparticules métalliques. Mon expérience avec les transaminases m'a ainsi permis d'imaginer une première voie de valorisation du HMF pour la synthèse de furfurylamines, par combinaison avec des nanoparticules métalliques développées par Robert Wojcieszak. Ce travail a été accéléré dans le cadre de la thèse d'Antoine Lancien que j'ai co-encadré avec celui-ci ainsi qu'avec Rénato Froidevaux. Ce projet a d'ailleurs été financé par l'I-Site ULNE (Université Lille Nord-Europe), démontrant l'intérêt des institutions et collectivités locale pour ce type de thématique.

Les furfurylamines sont des amines aromatiques classiquement formées par amination réductrice du furfural. Elles sont décrites dans la littérature comme étant des précurseurs intéressants pour la synthèse de polymères d'origine biologique tels que les polyamides, les polyimides, les polyaspartimides, les polyuréés, les polyhydroxyuréthanes, les polyimines, les polyénamines, etc. dont les monomères sont facilement synthétisés à partir de dérivés du furfural, lui-même pouvant être d'origine biosourcée.<sup>262</sup> On citera notamment la préparation de dérivés de benzoxazine pour des résines ignifugées,<sup>263,264</sup> ou, une fois converties en diisocyanates de difurfuryle, leur utilisation pour le remplacement du diphenylméthane diisocyanate pétrosourcé dans le cadre de la synthèse des polyuréthanes.<sup>265,266</sup> Bien qu'étant généralement réalisées dans des conditions relativement douces avec des réactifs peu coûteux,<sup>267</sup> leurs synthèses par amination de la fonction carbonyle furfural requièrent bien souvent un grand nombre d'étapes basées sur l'utilisation de groupements protecteurs, ainsi que l'emploi de réactifs toxiques et peu respectueux de

l'environnement. Pour contourner ces problèmes, plusieurs voies chemocatalytiques ont récemment été mises au point,<sup>267-271</sup> mais elles ne sont pas idéales pour la synthèse d'hydroxyméthylfurfurylamine et de ses dérivés oxydés à partir de HMF en raison de la sensibilité importante du cycle furanique aux conditions réductrices et de la tendance à former des amines secondaires et tertiaires.<sup>271-273</sup> Une autre façon efficace d'effectuer l'amination réductrice des dérivés du HMF réside dans l'utilisation des transaminases.<sup>107,274,275</sup> Plusieurs  $\omega$ -TA ont ainsi été utilisées pour la synthèse de plusieurs furfurylamine à partir de dérivés du HMF.<sup>273,276</sup> Dunbabin *et coll.* ont pu obtenir jusqu'à 92 % de rendement en produits aminés à partir de différents dérivés du HMF et du furfural. Parmi eux, ils ont pu réaliser la synthèse du 5-hydroxyméthyl-2-aminométhylfurane (HMFA), du 5-aminométhyl-2-furancarboxaldéhyde (AMFA), du furan-2,5-diylldiméthanamine (FDMA) et de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) (Figure 57). Toutefois, dans le cas de l'AMFC, Dunbabin *et coll.* n'ont pu effectuer la synthèse qu'à partir de son précurseur carbonylé direct, l'acide 5-aldéhyde-2-furancarboxylique (AFCA), au lieu du HMF, en raison de l'absence d'étapes d'oxydation préalables pour la production de cet intermédiaire dans le milieu réactionnel.

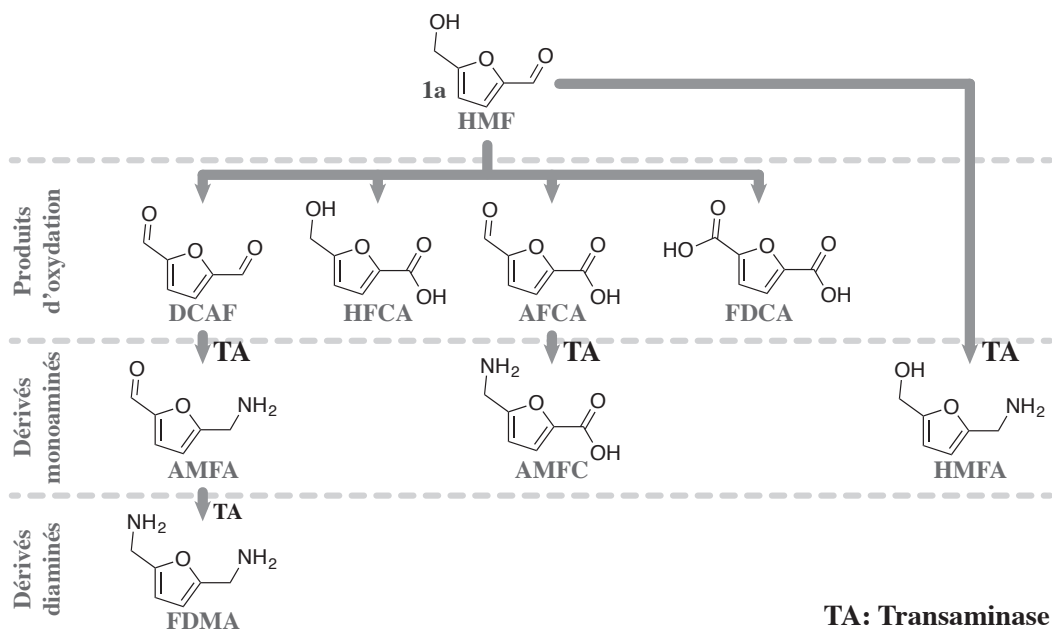


Figure 57 : Molécules pouvant être obtenues à partir de 1) l'oxydation des groupements hydroxyle et carbonyle du HMF : le 2,5-dicarboxaldéhydefurane (DCAF), l'acide 5-hydroxyméthyl-2-furancarboxylique (HFCA), l'acide 5-aldéhyde-2-furancarboxylique (AFCA) & l'acide 2,5-furandicarboxylique (FDCA) ; et 2) l'amination des dérivés carbonylés correspondants : le 5-hydroxyméthyl-2-aminométhylfurane (HMFA), le 5-aminométhyl-2-furancarboxaldéhyde (AMFA), l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) & la furan-2,5-diylldiméthanamine (FDMA)).

En effet, les synthèses de l'AMFA, du FDMA et de l'AMFC nécessitent une étape d'oxydation préalable pour obtenir un groupe aldéhyde ou acide carboxylique à partir du groupement hydroxyle. Pour le FDMA, le composé double aminé, cette étape doit être effectuée de préférence avant l'action des TA car les deux carbonyles pourraient alors être convertis simultanément par l'enzyme. Si l'HMFA s'est déjà révélé utile pour plusieurs applications, telles que la préparation de diurétiques, d'antihypertenseurs et d'agents antiseptiques et durcisseurs, l'AMFA et l'AMFC sont des synthons très prometteurs pour la synthèse des polymères, en raison de la présence de leurs fonctions aldéhyde et acide carboxylique. L'AMFA peut être

utilisé pour former des polymères à base d'imine selon un mécanisme d'autocondensation, tandis que l'AMFC, en tant qu'acide aminé, peut être utilisé pour produire des peptides non naturels comme les cyclopeptides.<sup>277,278</sup> Ces composés présentent un grand intérêt en raison de leur grande bio-activité. Étonnamment, très peu d'études ont fait état d'une synthèse réussie de ces deux composés et donc, trouver une méthodologie pour les produire en plus grandes quantités aiderait certainement à développer leur utilisation dans la synthèse des polymères. C'est justement ce challenge que nous avons choisi de relever à travers la réalisation d'une cette première voie hybride selon un procédé final en 1P2S combinant un catalyseur au platine pour la conversion du HMF and AFCA, suivi d'une transaminase immobilisée conduisant à la formation d'AMFC (Figure 58).

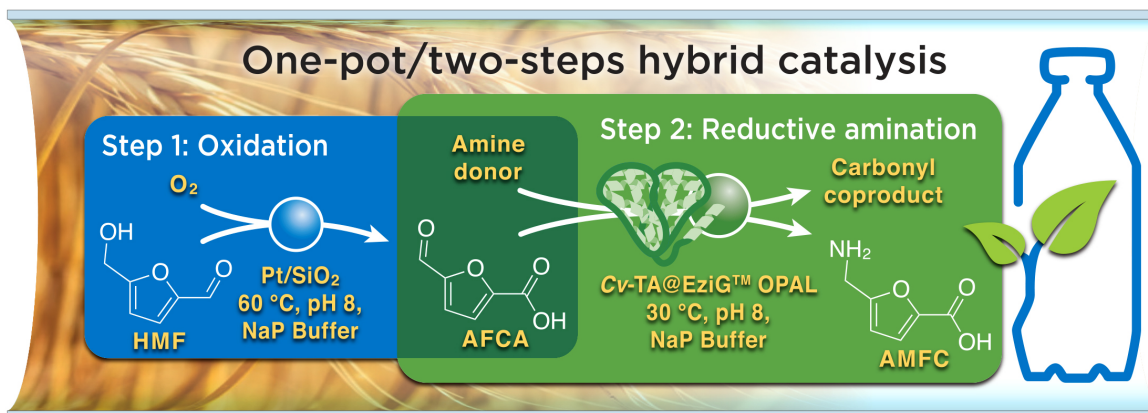


Figure 58 : Procédé catalytique hybride en *one-pot/two-steps* pour la synthèse de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) à partir du 5-hydroxyméthylfural (HMF) combinant un catalyseur hétérogène métallique d'oxydation et une transaminase immobilisée.

Le Pt/SiO<sub>2</sub> a été sélectionné pour sa capacité à transformer à 60 °C le HMF en AFCA à l'issue du criblage de 15 nanoparticules mono- ou bimétalliques supportées synthétisées selon différentes approches (Au/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Au/Amberlyst, Au/CaO, Au<sub>PVA</sub>/CaO, Au/CeO<sub>2</sub>, Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Pd/TiO<sub>2</sub>, Pt/SiO<sub>2</sub>, Ru/Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, Au+Pd/TiO<sub>2</sub>, Au+Pd/ZrO<sub>2</sub>, Au+Pt/TiO<sub>2</sub>, Pt+Pd/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et Pt+Pd/TiO<sub>2</sub>). Au bout de 24 h, seul le Pt/SiO<sub>2</sub> a en effet permis d'obtenir un rendement supérieur à 80 % en produit désiré. De manière intéressante, plusieurs mécanismes d'oxydations ont pu être identifiés avec les différents catalyseurs criblés. Ceci fera l'objet d'étude plus approfondies par la suite. Nous avons ensuite mesuré l'activité envers l'AFCA de la transaminase de *Chromobacterium violaceum* (Cv-TA, Q7NWX4) que j'avais récemment produite au laboratoire. Nous avons aussi étudié sa thermostabilité, et avons mis au point son immobilisation sur un support commercial innovant : le EziG™ OPAL. Ce support est commercialisé par la société EnginZyme avec laquelle j'avais déjà eu l'occasion de travailler sur REALCAT. Malheureusement, la Cv-TA a montré une faible thermostabilité à 60 °C, ce qui nous a dans un premier temps empêché d'envisager la réalisation d'un procédé en 1P1S. Nous avons donc commencé la mise en œuvre de cette réaction hybride selon un procédé en 1P2S, la transaminase étant ajoutée une fois qu'un maximum de HMF aurait été oxydé en AFCA par le Pt/SiO<sub>2</sub>. En utilisant de la (*S*)-méthylbenzylamine comme donneur pour l'étape de transamination, cette première réalisation a abouti à la complète conversion du HMF en 48 h, et a permis d'obtenir l'AMFC au bout de 52 h de réaction totale avec un rendement final de 77 % (Figure 59). En supplément, du FDCA a été produit comme unique sous-produit avec un rendement de 21 %. Il convient de noter qu'un rendement respectif de 67 % et 20 % en AMFC et en FDCA a pu être récupéré après purification sans optimisation supplémentaire. Afin de voir si nous pouvions mettre en œuvre



ce procédé avec un donneur d'amine plus léger pour en réduire le cout carbone, nous l'avons reproduit avec de l'isopropylamine, et avons obtenus des rendements similaires avec 67 % et 27 % en AMFC et FDCA respectivement. Ces travaux ont fait l'objet d'un article dans le journal *ChemCatChem* en 2021.<sup>279</sup> Il a d'ailleurs été sélectionné par l'éditeur pour apparaître sur la couverture du tout premier numéro de *ChemCatChem* de 2021 (Figure 60).

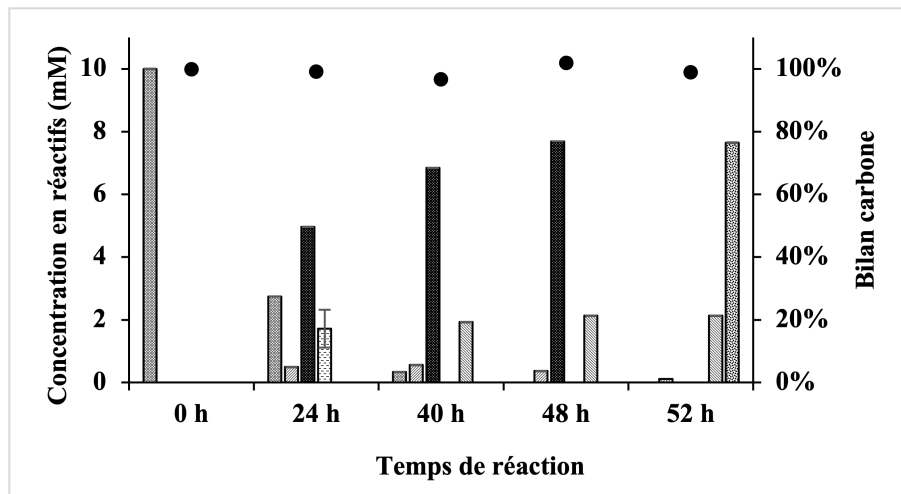


Figure 59 : Concentrations en HMF, HFCA, AFCA, FDCA, et AMFC mesurées tout au long de la réaction hybride en *one-pot/two-steps* combinant du Pt/SiO<sub>2</sub> et la Cv-TA/EziG™ OPAL.

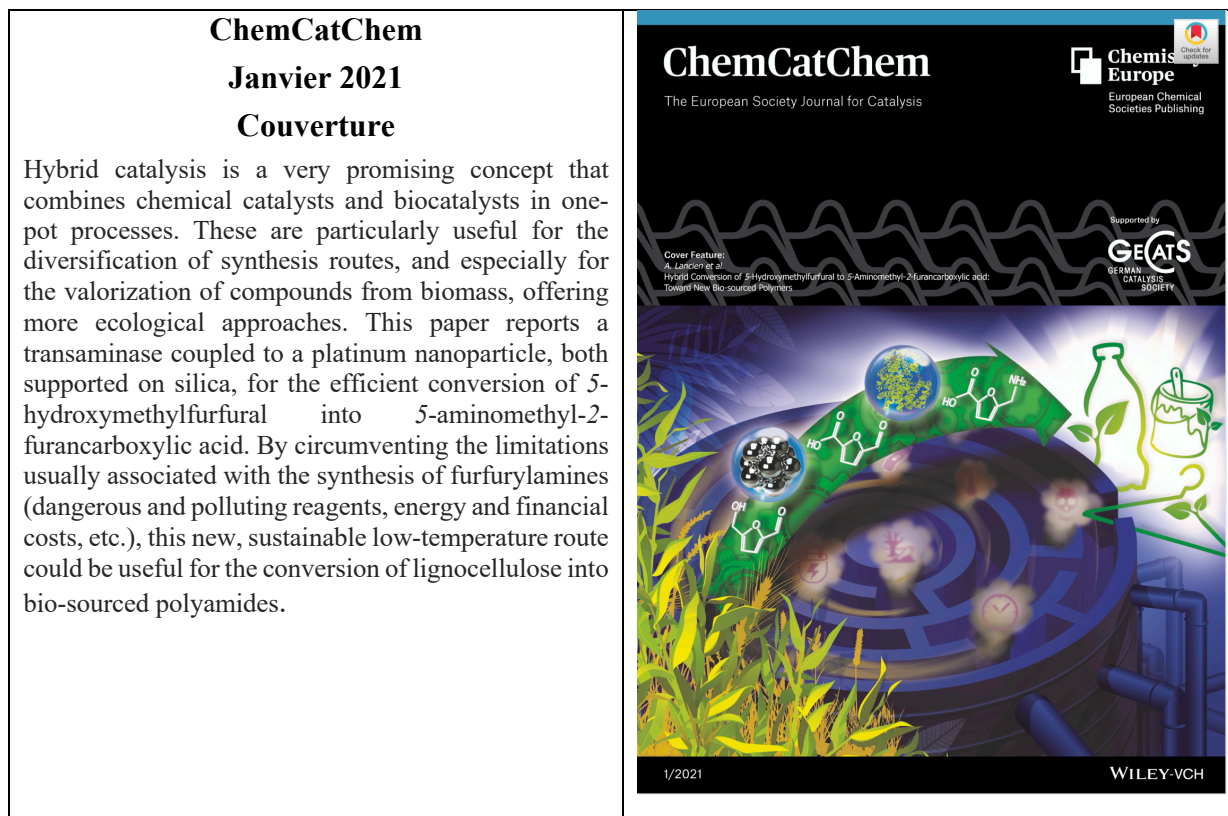


Figure 60: Couverture du numéro du volume 13 de la revue *ChemCatChem* de janvier 2021 décrivant la combinaison de nanoparticules de platine immobilisées sur silice avec une transaminase pour la synthèse d'AMFC à partir d'HMF.

Ainsi, forts de cette première approche, nous avons amélioré le concept en découvrant une nouvelle enzyme thermostable (acc. num. UniProt : B9AZ94, *Burkholderia multivorans*, Bm-TA). Celle-ci nous a été fournie, avec 4 autres candidates potentielles, par le Pr. Uwe Bornscheuer (Université de Greifswald, Allemagne). L'étude de cette enzyme a ainsi permis de mettre en évidence une bonne stabilité à 60 °C ainsi qu'une activité maximale à cette température, paramètres essentiels pour la réalisation de notre procédé en 1P1S cette fois (Figure 61). En parallèle, nous avons aussi réalisé le criblage 35 nouveaux catalyseurs métalliques (mono- ou bimétalliques, avec différents ratios en métal, incluant de l'Au, du Pt, du Pd et du Ru sur différents supports, synthétisés selon différentes approches (majoritairement par sol immobilisation)) pour étudier leur capacité à oxyder le HMFA. En effet, la transaminase étant globalement nettement plus active que les catalyseurs chimiques que nous avons étudiés jusque-là, nous avons envisagé la réalisation de la réaction inverse par rapport à celle qui a déjà été publiée, la transaminase intervenant durant la première des deux étapes. Pour réaliser ce criblage nous avons utilisé BioLector Pro, la qui est la version évoluée du BioLector précédemment décrit, ce qui nous a permis de réaliser les réactions à 50 °C en maintenant une très bonne homogénéisation du milieu, associé à un meilleur transfert d'oxygène pour la réaction d'oxydation. Après comparaison avec le même criblage en vials, nous avons d'ailleurs pu observer des cinétiques de conversion systématiquement meilleures dans le cas du BioLector, démontrant l'utilité d'un tel outil en catalyse, et établissant une nouvelle passerelle entre les disciplines de la chimie et de la biologie. A l'issue du criblage, nous avons pu sélectionner plusieurs catalyseurs particulièrement efficaces, dont le  $\text{Au}_{\text{PVA}}/\text{TiO}_2$  (2 % w/w) qui a permis de réaliser 97 % de conversion en HMFA avec une sélectivité de 87 % pour l'AMFC et de 7 % pour l'AMFA en 48 h de réaction. En parallèle, les résultats obtenus nous ont également amené à mettre en évidence un phénomène de désamination oxydative avec certains catalyseurs. Ce type de réactivité n'avait encore jamais à notre connaissance été reporté avec cette famille de catalyseurs, et après avoir complété ces premiers tests avec d'autres substrats aminés, ces résultats ont fait l'objet d'une publication dédiée dans la revue *ChemNanoMat* en 2022.

Possédant désormais deux nouveaux catalyseurs plus efficaces pour la conversion du HMF en AMFC à 60 °C, nous avons tout récemment procédé à la réalisation d'un plan d'expérience pour étudier l'influence des différents paramètres de la réaction, comme les concentrations et proportions respectives en catalyseurs, la température, le pH, etc. Les résultats de cette série d'expériences sont encore en cours analysés, mais la meilleure condition a d'ores et déjà permis de réaliser la conversion du HMF and AMFC avec un rendement supérieur à 48 % en 48 h selon le tout nouveau procédé *one-pot/one-step* souhaité. Ceci confirme nos intuitions concernant la faisabilité d'une telle synthèse, et plus largement la combinaison de nanoparticules métalliques pour l'oxydation d'alcools avec l'animation réductrice des carbonyles générés par une transaminases à température modérée. Ce premier concept ouvre donc la voie à un panel de nouvelles molécules transformables, et nous avons déjà commencé à en étudier plusieurs dont certaines biosourcées comme la lévoglucosénone, un synthon plateforme très prometteur dans la valorisation de la biomasse.

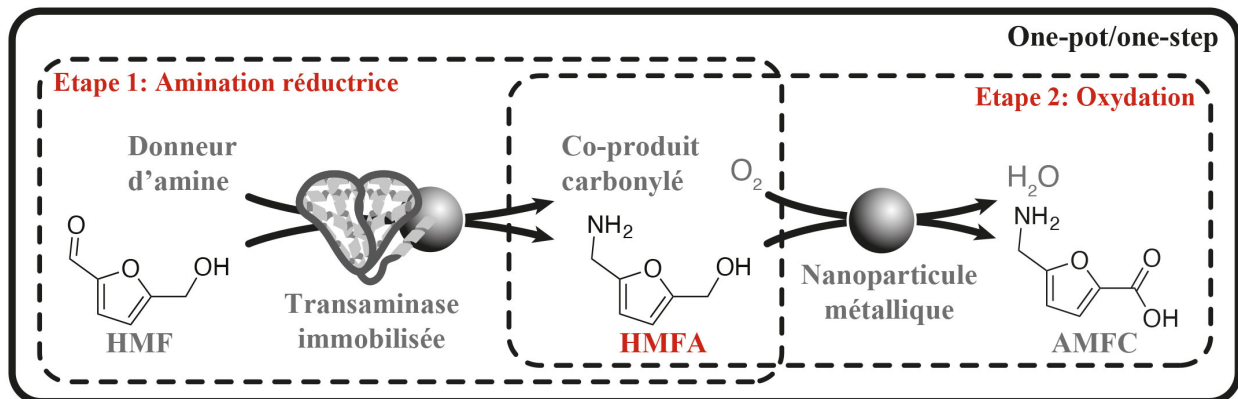


Figure 61 : Concept de procédé catalytique hybride en *one-pot/one-step* pour la synthèse de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) à partir du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) combinant successivement une transaminase immobilisée et un catalyseur hétérogène métallique d'oxydation.

### *Valorisation de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique par biocatalyse et catalyse hybride pour la production de nouveaux biosurfactants*

Ayant à notre disposition un nouveau synthon biosourcés, l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique, nous avons voulu voir si nous pouvions proposer de nouvelles voies de fonctionnalisation de ce dernier pour accroître son champ d'application. Compte-tenu de la présence d'une fonction amine et d'une fonction acide, il nous a semblait dans un premier temps évident qu'il était possible de former de nouvelles liaisons de type amide ou ester, en couplant la molécule soit à un acide, soit à un alcool, suivant la fonction ciblée. Dans un premier temps nous nous sommes concentrés sur la formation des dérivés amides de l'AMFC, en le couplant avec des chaînes grasses pour tenter d'obtenir des molécules surfactantes qui pourraient avoir des propriétés intéressantes pour la pharmacologie et la cosmétiques, mais également pour des applications antimicrobiennes comme nous l'avons évoqué dans le chapitre sur les lipopeptides. A cette occasion je me suis associé à l'équipe de la Pr. Anne Zaparucha (Génoscope), qui développe la famille des acétylCoA ligases (ACL), des enzymes justement capables de synthétiser ce type de fonctions en conditions douces. Fait encore plus intéressant, Anne Zaparucha et son équipe venaient de publier la découverte de plusieurs acétylCoA ligases thermostables jusqu'à plus de 60 °C,<sup>280</sup> les rendant compatibles avec nos procédés hybrides. Les ACL sont des enzymes appartenant à la superfamille des enzymes formant des adénylates, qui comprend les acyl- et aryl-CoA synthétases, les peptides synthétases non ribosomiques et les luciféras, et qui sont responsables d'un grand nombre de processus biologiques. Les ACL catalysent la formation ATP-dépendante d'acyl-CoA thioesters à partir d'acides carboxyliques dans une réaction en deux étapes : premièrement, formation d'un dérivé adénylate à partir d'un acide carboxylique et d'ATP, deuxièmement, attaque nucléophile du coenzyme A (CoA-SH).<sup>281</sup> Le détournement de la réaction native par l'ajout d'un nucléophile amine supplémentaire en l'absence de CoA-SH conduit à la formation d'amides.<sup>280,282,283</sup> Les ACL représentent donc un système biocatalytique alternatif pour la synthèse d'amides. Nous avons ainsi voulu voir si nous pouvions les utiliser pour greffer différentes chaînes aliphatiques linéaires, aromatiques ou même fonctionnalisées, sur l'amine de l'AMFC pour lui conférer de nouvelles propriétés. Toujours dans l'esprit de proposer de nouvelles voies de synthèses hybrides, nous avons également voulu voir si nous pouvions coupler cette étape à l'oxydation d'alcools pour générer *in situ* les acides substrat des ACL (Figure 62).

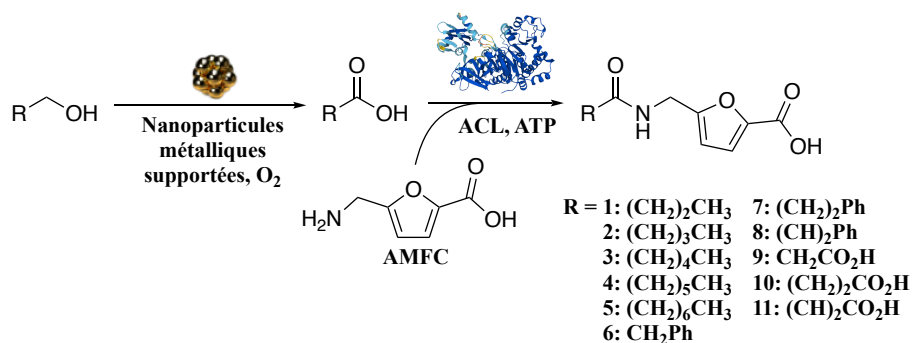


Figure 62 : Nouvelle voie hybride pour la formation d'amides de l'AMFC par couplage d'ac\u00e9lCoA ligases et de nanoparticules m\u00e9talliques support\u00e9es.

Pour cela nous avons commenc\u00e9 par r\u00e9aliser un premier criblage sur 5 ACL afin de mesurer leur capacit\u00e9 \u00e0 activer les diff\u00e9rents acides que nous avons s\u00e9lectionn\u00e9s, en pr\u00e9sence d'un exc\u00e8s d'AMFC pour tenter de produire les amides correspondants. Parmi elles, l'ACL de *Geobacillus thermodenitrificans* (acc. num. UniProt : A4INB3) a d\u00e9montr\u00e9 une bonne activit\u00e9 sur les chaines aliphatiques jusqu'\u00e0 7 carbones, ainsi que pour les acides substitu\u00e9s avec des groupements ph\u00e9nyl, offrant jusqu'\u00e0 52 % de rendement avec l'acide 3-ph\u00e9nylpropano\u00efque. Dans le m\u00eame temps, il a \u00e9t\u00e9 v\u00e9rifi\u00e9 si l'AMFC pouvait \u00e9galement \u00eatre un bon substrat pour les ACL, celui-ci portant \u00e9galement une fonction acide carboxylique. Nous avons pour cela effectu\u00e9 des r\u00e9actions en pr\u00e9sence de butylamine comme nucl\u00e9ophile externe et sans nucl\u00e9ophile, afin de tester la capacit\u00e9 de l'AMFC \u00e0 r\u00e9agir sur lui-m\u00eame et \u00e0 conduire \u00e0 la formation d'un dim\u00e8re. En r\u00e9sultat, l'AMFC s'est av\u00e9r\u00e9 \u00eatre un mauvais substrat pour les ACL s\u00e9lectionn\u00e9es, ne produisant que des traces du butylamide correspondant en pr\u00e9sence de butylamine et la formation d'un dim\u00e8re n'a \u00e9galement pas pu \u00eatre observ\u00e9e. Un second criblage, des catalyseurs chimiques cette fois, a \u00e9galement \u00e9t\u00e9 men\u00e9 en parall\u00e8le sur deux alcools, le butanol et le pentanol, pour \u00e9valuer leur capacit\u00e9 \u00e0 former les acides correspondant dans les conditions r\u00e9actionnelles des enzymes. Ayant d\u00e9montr\u00e9 de tr\u00e8s bonnes capacit\u00e9s d'oxydation en milieu tamponn\u00e9 lors de nos \u00e9tudes pr\u00e9c\u00e9dentes, nous avons d'abord choisi d'utiliser des nanoparticules d'or immobilis\u00e9es sur 6 mat\u00e9riaux diff\u00e9rents pr\u00e9sentant des propri\u00e9t\u00e9s acides, basiques ou neutres. Nous avons additionnellement cribl\u00e9 2 catalyseurs avec des nanoparticules de palladium \u00e0 la place de l'or, ainsi que 4 pour lesquels nous avons co-immobilis\u00e9 les deux types de m\u00e9taux. \u00c0 l'issue du criblage, l'Au/CaO a clairement montr\u00e9 une activit\u00e9 sup\u00e9rieure \u00e0 celle des autres catalyseurs, avec > 99 % de conversion de l'alcool en acide \u00e0 50 \u00b0C en 48 h de r\u00e9action. Nous avons alors tent\u00e9 de combiner les deux catalyseurs sous la forme d'un proc\u00e9d\u00e9 en 1P1S, en utilisant le butanol et le pentanol comme alcools de d\u00e9part. Cependant, de la m\u00eame mani\u00e8re qu'avec les transaminases, nous avons observ\u00e9 une forte diminution de l'activit\u00e9 du catalyseur chimique. Ceci est probablement accentu\u00e9 par le fait qu'ici l'enzyme n'\u00e9tait pas immobilis\u00e9e et risque dont de s'agr\u00e9ger \u00e0 la surface du catalyseur chimique. Nous avons en cons\u00e9quence transpos\u00e9 notre couplage vers un proc\u00e9d\u00e9 en 1P2S (Figure 70), avec le catalyseur chimique en premi\u00e8re \u00e9tape, suivi par l'ajout de l'enzyme une fois l'alcool converti en acide. Si nous avons \u00e0 nouveau pu observer une conversion compl\u00e8te lors de la premi\u00e8re \u00e9tape, l'ajout de l'enzyme n'a conduit qu'\u00e0 une tr\u00e8s faible formation du produit d\u00e9sir\u00e9. La suppression du catalyseur chimique par filtration avant l'ajout de l'enzyme n'a pas r\u00e9ellement permis d'am\u00e9liorer ce rendement. En revanche, nous avons pu observer dans les deux cas que 66 % et 43 % de l'acide butano\u00efque et pentano\u00efque respectivement avait \u00e9t\u00e9 consomm\u00e9. Compte-tenu du fait que les criblages enzymatiques ont \u00e9t\u00e9 fait \u00e0 tr\u00e8s faible volume et faible concentration, nous en avons conclu qu'il \u00e9tait important d'optimiser la r\u00e9action biocatalytique, notamment en faisant varier les concentrations en amine nucl\u00e9ophile (AMFC) et en cofacteur, afin d'essayer d'am\u00e9liorer le rendement de la deuxi\u00e8me \u00e9tape.

Néanmoins nous restions confiants quant à la réalisation prochaine de cette voie hybride de formation de furfurylamides. Cette étude, qui a été initiée durant la thèse d'Antoine Lancien, et poursuivie dans le cadre du Post-Doctorat du Dr. Jonathan Bassut, démontre une fois de plus l'importance de compartimenter les deux catalyseurs afin d'éviter les effets d'inhibition croisée.

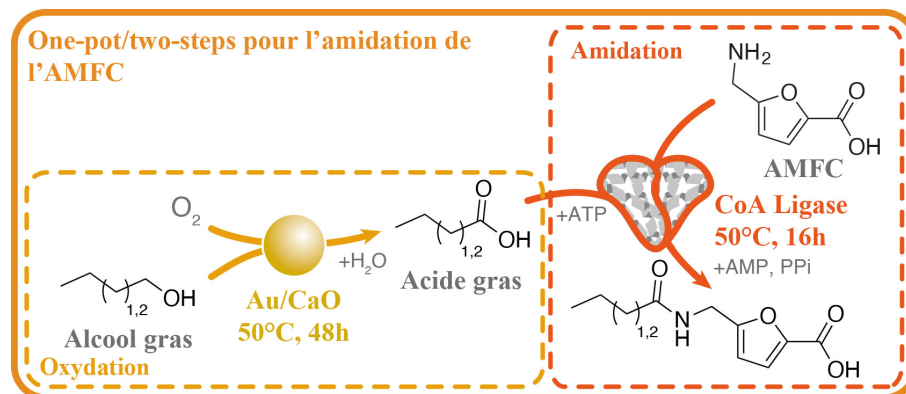


Figure 63 : Concept de procédé en *one-pot/two-steps* pour la synthèse d'amide gras de l'AMFC à partir de butanol et de pentanol.

**Résumé de ma contribution :** Pour le projet mettant en jeu le nouveau réacteur en H pour la synthèse du HMF à partir du glucose, mon implication est demeurée assez minime. J'ai quelque peu aidé la doctorante dont la thèse portait sur cette thématique, notamment lors de ses expérimentations sur REALCAT, mais mon principal apport fut la conception du système de pales permettant d'homogénéiser les deux compartiments du réacteur. En revanche, les procédés de synthèse et de valorisation des furfurylamines découlent directement des concepts que j'ai cherché à mettre en œuvre, se basant notamment sur plusieurs transaminases que j'avais eu l'occasion d'étudier durant mon doctorat. Pour ces réalisations j'ai été amené à superviser la thèse de plusieurs étudiants, dont celle d'Antoine Lancien qui est à l'origine de la plupart de ces résultats, ainsi qu'un Post-Doctorant, le Dr. Jonathan Bassut, qui les a poursuivies jusqu'à l'année dernière. Également, le développement de mon activité en catalyse hybride au sein de l'UCCS m'a permis de coordonner la publication de plusieurs revues et dossier de vulgarisation sur le sujet, aidant à la visibilité de cette thématique au sein de la communauté scientifique

### Thématique 3.2 : essais préliminaires de conception de matériaux multi-catalytiques hybrides (MMCH) à base de *Metal-Organic Frameworks* (MOF)

#### *Intérêt des matériaux multi-catalytiques hybrides et choix des metal-organic-frameworks pour leur conception*

Compte-tenu des effets d'empoisonnement décrit précédemment, et de manière plus générale, de l'incompatibilité inhérente à de nombreux catalyseurs chimiques et biologiques, les recherches dans ce domaine sont très vite arrivées à la conclusion qu'il fallait trouver un moyen de faire cohabiter les deux espèces de catalyseurs tout en les maintenant séparés, si possible dans des compartiments dédiés localisés très proches les uns des autres pour réduire les limitations associées à la diffusion des substrats, et bénéficier des avantages des procédés en 1P1S (chauffage unique, pas de purification, infrastructure simplifiée, et effets de synergie entre les sites actifs). En effet, une solution à ce problème pourrait être, comme nous

l'avons vu, la mise en œuvre de procédés en 2P1S, qui ont effectivement permis à maintes reprises de supprimer les effets d'empoisonnement croisé. Mais une fois encore, ce type de combinaison se fait au sacrifice de la proximité des sites actifs et de la simplicité de mise en œuvre qu'offre un système en *one-pot*. L'alternative qui tente de concilier tous les avantages repose donc sur la co-immobilisation des centres actifs au sein d'un unique et même support. Ceci aboutit à la création d'un nouveau type de catalyseurs, que l'on pourra qualifier de matériaux multi-catalytiques hybrides ou MMCH. Ceux-ci représentent ainsi le niveau d'intégration maximal en catalyse hybride et qui sont par conséquent considérés d'une certaine façon comme le *Graal* de la discipline. Cet aspect a d'ailleurs été souligné dans de multiples revues,<sup>99,103,214,223,284-287</sup> dont plusieurs très récentes dédiées aux MMCH,<sup>167,288,289</sup> incluant celle que nous avons publiée en 2021 dans le journal *Green Chemistry*.<sup>290</sup> Comme souligné à travers ces différentes publications, de la même façon que pour la catalyse hybride dans son ensemble, il existe de nombreuses façons de combiner des biocatalyseurs et des catalyseurs chimiques sous la forme d'un même matériau. Il n'est d'ailleurs pas nécessaire pour cela d'avoir recours à l'utilisation d'un matériau tiers. Plusieurs études ont ainsi fait part de la combinaison directe d'enzymes par exemple avec des nanoparticules métalliques, en utilisant directement le squelette protéique comme support. Ces MMCH font dès lors partie des métalloenzymes, comme nous l'avons précédemment décrit, mais précisons que cela ne concerne bien ici que les représentants de cette famille arborant effectivement deux centres catalytiques distincts et utilisés de manière active en synthèse. Le premier exemple de ce type de MMCH a été conçu par croissance de nanoparticules de Pt au sein de l'aminopeptidase de *Streptococcus pneumonia* (PepA).<sup>166</sup> Cette aminopeptidase au Zn s'auto-assemble en un complexe tétraédrique dodécamérique bien défini avec des diamètres externes et internes de ~12 et 6 nm, respectivement (Figure 64), ce qui laisse suffisamment de place pour la croissance des nanoparticules en son centre. En outre, la structure PepA présente des canaux de 1 et 3 nm de diamètre au centre des faces tétraédriques et sur les bords, respectivement, ce qui permet l'entrée des précurseurs nécessaires à la synthèse des nanoparticules de Pt ainsi que l'entrée et la sortie des substrats et des produits des réactions catalytiques. La structure du multimère a ainsi permis aux auteur·rice·s de réaliser la synthèse contrôlée de très petites nanoparticules d'une taille comprise entre 0,9 et 3,2 nm. Cet exemple montre l'importance d'une connaissance très approfondie de la structure 3D de l'enzyme utilisée pour la réalisation de ce type de MMCH. À la fin de la synthèse, les auteur·rice·s ont pu confirmer que les nanoparticules se trouvaient bien à l'intérieur des cavités de l'enzyme et non à sa surface. De manière intéressante, les enzymes ainsi modifiées présentaient une teneur en ions Zn inférieure à la teneur naturelle, ce qui indique que ces ions ont été partiellement échangés contre des ions Pt dans le site actif. Le nouveau MMCH ainsi obtenu combine l'activité catalytique de l'enzyme avec celle des nanoparticules de Pt et a été utilisée pour la déprotection de l'acide *p*-nitroanilideglutamique suivie de la réduction de la *p*-nitroaniline générée en *p*-phénylènediamine (Figure 64).

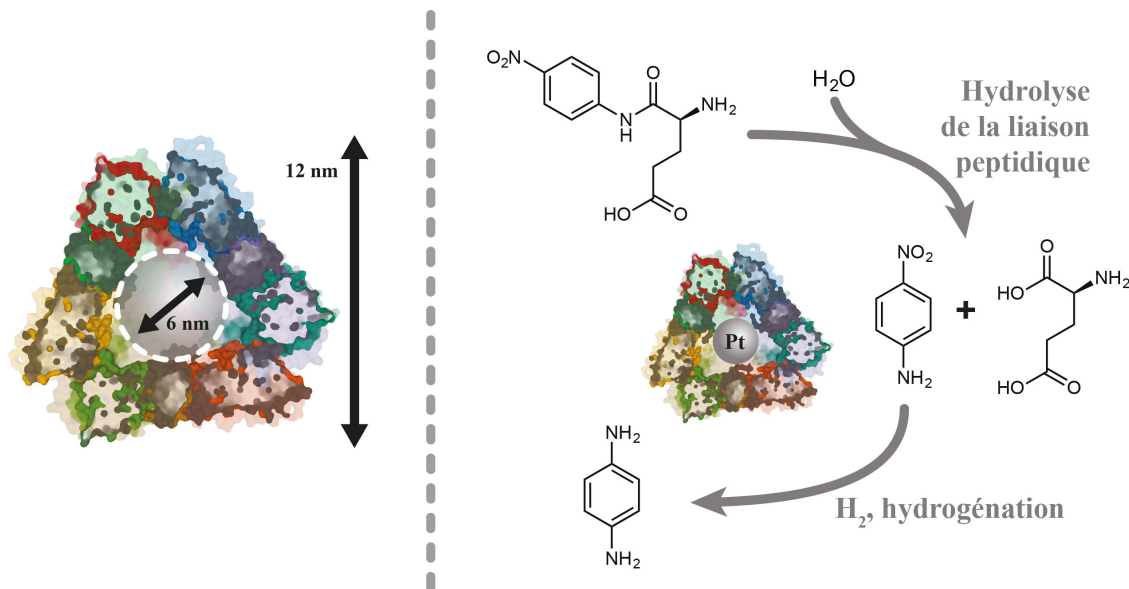


Figure 64 : Matériau multi-catalytique hybride (MMCH) conçu par croissance de nanoparticules de platine au sein de la cavité formée par le dodécamère de l'aminopeptidase de *Streptococcus pneumoniae*. Ce MMCH a été appliqué à la conversion en tandem séquentiel de l'acide *p*-nitroanilideglutamique en *p*-phénylènediamine.

Notons que ce cas reste assez exceptionnel car il requière effectivement un système enzymatique présentant une cavité suffisamment large et bien structurée que pour pouvoir y faire croître les nanoparticules, ce qui est assez rare chez les enzymes utilisées en biocatalyse. Un peu plus éloigné des métalloenzymes, il est également possible de toujours bénéficier du squelette protéique pour l'immobilisation du catalyseur chimique, mais sans pour autant concevoir une entité unique définie. Plusieurs études ont ainsi fait croître des nanoparticules métalliques au sein de CLEA, lesquels peuvent d'ailleurs être formés directement à partir de celle-ci.<sup>164,165,174,291,292</sup> Le gros avantage de cette approche par rapport à la précédente réside en la possibilité de s'affranchir de cette contrainte structurale au niveau de l'enzyme, cette stratégie étant beaucoup plus universelle. En contrepartie, il est évidemment moins facile de contrôler le positionnement des centres catalytiques les uns par rapport aux autres dans cette situation, et l'on sacrifie encore un peu plus l'intérêt d'un MMCH au profit d'une facilité de synthèse. De manière générale, ce type d'agencement sans support tiers n'offre qu'une possibilité de compartimentation des centres actifs très minimale, ce qui la cantonne uniquement à la co-immobilisation de catalyseurs très *tolérants* les uns vis-à-vis des autres, et des conditions réactionnelles.

Une alternative consiste donc à utiliser une structure externe, inerte ou non, qui permet de sélectivement immobiliser chaque catalyseur à un emplacement défini, soit grâce à une différence de taille, à une fonctionnalisation différentielle, ou à toute autre méthode sélective des types de catalyseurs mis en jeu. Plusieurs études ont ainsi proposé l'utilisation de composés et polymères organiques pour jouer ce rôle,<sup>156,293-296</sup> mais elles se trouvent bien souvent confrontées aux mêmes limitations que celles des CLEA. On pourra tout de même citer la combinaison de la lipase B de *Candida antarctica* et de groupes chimiquement réactifs dérivés du 3-aminopropyltriméthoxysilane (APTMS), activés avec du glutaraldéhyde (GAH), proposée par la Dr. Rudina Bleta (UCCS).<sup>297</sup> Cette étude compare justement l'immobilisation au sein d'un matériaux structuré à l'aide de cyclodextrines (*randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin*, RaMe $\beta$ CD), avec celle réalisée de manière similaire sur des particules obtenues à partir d'un hydrogel de silice. En résultat, les RaMe $\beta$ CD ont effectivement permis d'immobiliser l'enzyme au sein des

cavités qu'elles génèrent plutôt qu'en surface des particules, ce qui a eu pour conséquence d'améliorer les propriétés de la lipase. Un autre exemple intéressant et celui proposé par Gao *et coll.*, lesquels ont construit un nouveau MMCH présentant deux localisations distinctes pour les catalyseurs. Les nanoparticules de Pt et Pd sont en effet d'abord encapsulées dans un polymère de dopamine, après avoir formé des micelles à l'aide d'un détergent non-ionique, le Pluronic F-127. Une fois le polymère formé, et le F-127 retiré du matériau, les enzymes, ici à nouveau les lipases A et B de *Candida antarctica*, sont greffées en surface et dans les cavités laissées par le F-127. Les auteurs ont également démontré qu'il était possible d'immobiliser à la place une hydrolase de composés organophosphorés. Dans les deux cas le MMCH a pu être appliqué en synthèse soit pour des DKR, soit pour la production de *para*-aminophénol à partir de *O,O*-diméthyl *O*-(4-nitrophenyl) phosphorothioate, et à chaque fois démontrée une activité améliorée vis-à-vis des catalyseurs isolés. Ces deux études démontrent ainsi l'importance d'une compartimentation fine des centres actifs. Malgré ces deux récents exemples, lorsque l'on cherche à atteindre cet objectif, il semble toujours plutôt conseillé de se tourner vers des matériaux inorganiques, dont les pores bien structurés et modulables ont souvent été mis à contribution pour l'immobilisation contrôlée de catalyseurs. Les exemples de MMCH à base de supports inorganiques sont également de plus en plus nombreux,<sup>168,298-308</sup> aidés par la très grande diversité de matériaux disponibles aujourd'hui, et de leurs propriétés respectives. Historiquement, ce sont surtout les silices,<sup>168,298,299,303-307</sup> et un peu les zéolites,<sup>301,302,308</sup> qui ont été les plus employées pour la conception de tels matériaux, les premières sûrement grâce à leur emploi régulier dans le domaine de la biocatalyse, et les secondes dans celui de la catalyse hétérogène. Plus récemment, nous avons pu voir apparaître un 3<sup>ème</sup> type de matériau dont l'intérêt semble croître très rapidement pour la co-immobilisation de centres catalytiques métalliques et d'enzymes : les *metal-organic frameworks* (MOF). Les MOF, autrement connus sous le nom de « *porous coordination polymers* » (PCP), sont synthétisés par auto-assemblage d'ions métalliques ou « de *polyoxo-clusters* » (métaux de transition du groupe 3d, métaux du groupe 3p ou lanthanides) avec des ligands organiques ditopiques ou polytopiques (carboxylates, groupes donneurs d'azote, sulfonate, ou phosphonate), sous la forme de cristaux hautement poreux (canaux). Notons qu'au vu de la diversité de ces éléments, les MOF sont souvent synthétisés par une approche essai-erreur.<sup>309</sup> Le temps requis par cette dernière peut alors être considérablement réduit à l'aide d'outils à haut débit comme ceux disponibles sur la plateforme REALCAT comme j'aurai l'occasion de le présenter juste après. L'avènement du concept de « synthèse isoréticulaire », introduit en 2002 par O'Keeffe et Yaghi,<sup>309,310</sup> régit depuis lors la synthèse des MOF, permettant depuis près de 20 ans de créer de nouvelles structures avec des tailles de pores, des formes et des fonctions presque illimitées. Cette grande versatilité est évidemment liée à la grande variété de métaux et de ligands qu'il est possible d'employer pour leur synthèse, mais aussi au fait qu'il soit possible de les post-fonctionnaliser, tant au niveau des centres métalliques que des ligands,<sup>311</sup> par remplacement de ces derniers après l'étape de synthèse. Plusieurs études décrivent d'ailleurs la possibilité de réaliser des MOF multi-métalliques et multi-ligands, même si en pratique ces derniers sont assez difficiles à synthétiser.<sup>312,313</sup> C'est cette versatilité tant en termes de structure que de synthèse qui est particulièrement intéressante pour le design de MMCH (Figure 65). Plus encore, il a été mis en évidence ces dernières années, à travers plusieurs études utilisant des MOF pour le support de catalyseurs chimiques et biologiques, que ces matériaux permettaient également, de par cette versatilité, de contrôler finement la position des centres catalytiques au sein de leurs pores. A l'instar d'une enzyme, le réseau poreux définit une géométrie et une forme spécifique de l'espace de réaction (topologie) qui influence la distance entre les sites actifs permettant une activation coopérative des substrats. Bien évidemment, de nombreux paramètres entrent en jeu pour expliquer ces effets, incluant notamment la taille des pores pouvant augmenter dans certains cas rendement et sélectivité des réactions, mais aussi et surtout la



composition des ligands, ces derniers pouvant présenter des groupes fonctionnels capables de produire une grande variété d'effets électroniques avec les substrats et les centres catalytiques. Ces paramètres et leurs effets ont été résumés dans plusieurs revues, montrant comment l'aspect modulaire des MOF permet de jouer avec ces derniers et d'optimiser l'espace catalytique du matériau ainsi formé.<sup>314</sup>

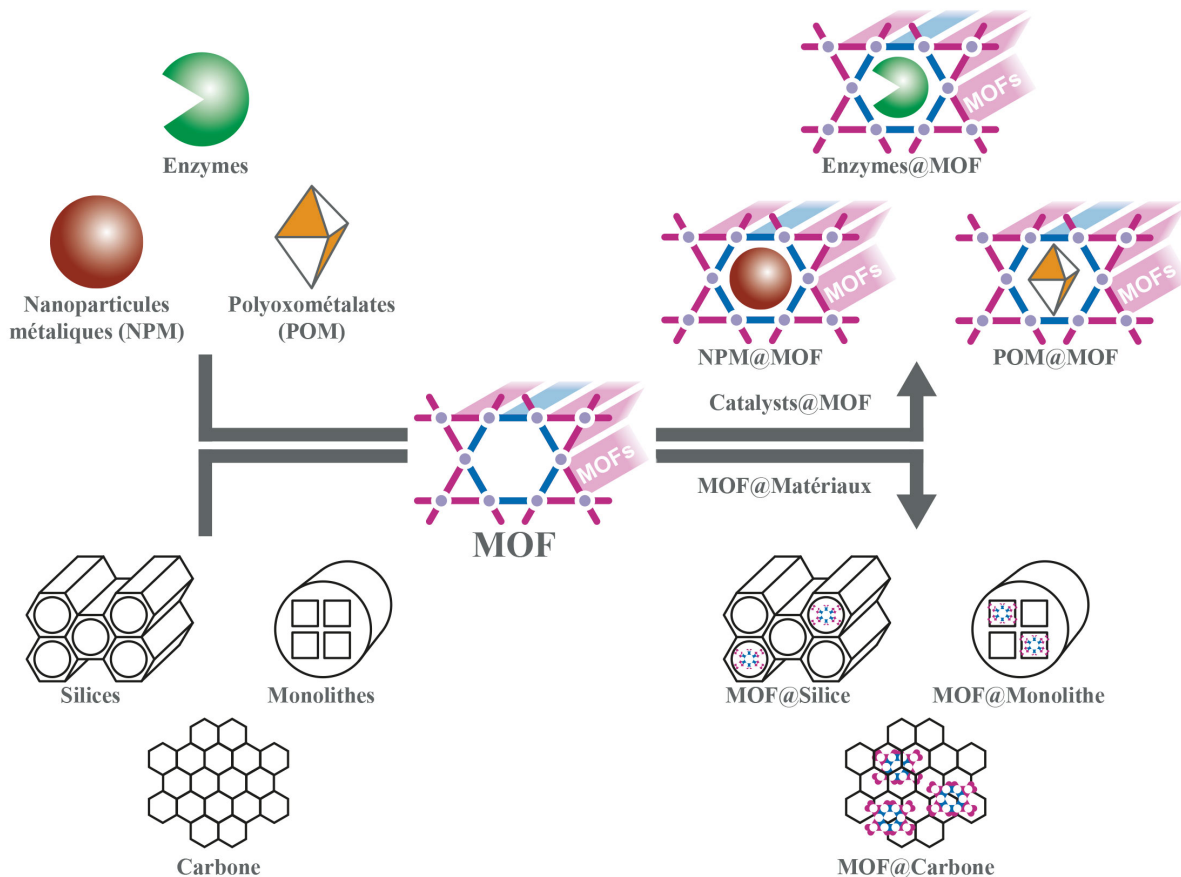


Figure 65 : Diversité de fonctionnalisation et d'incorporation des MOF pour l'élaboration de matériaux aux propriétés multiples, y compris catalytiques.

(Illustration inspirée de Chen et Xu, 2019)<sup>315</sup>

En effet, nombreuses sont les études qui font état de l'utilisation de MOF pour la conception de biocatalyseurs hétérogènes efficaces. L'attrait pour ce type de matériau pour l'immobilisation d'enzymes est tel que le nombre d'exemples a littéralement explosé ces dernières années, avec pas moins de 3 revues générale sur le sujet,<sup>316-318</sup> et de 15 exemples depuis le début de l'année 2023 uniquement.<sup>319-335</sup> Ajoutons que les approches d'immobilisations sont également très variées, que ce soit par immobilisation de surface (adsorption ou covalente) ou par incorporation dans le matériau (coprécipitation, encapsulation ou incorporation dans les pores), sur des MOF pouvant prendre autant de formes différentes (structures poreuses classiques, nanofleurs, *core-shell*, etc.). Si l'on doit cette prévalence des MOF pour l'immobilisation d'enzymes sur ces dernières années c'est notamment grâce à leurs nombreuses propriétés structurales et chimiques. On pourra citer leur surface spécifique particulièrement élevée (jusqu'à 10000 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>), mais également leur structure poreuse de taille ajustable (de quelques angströms à plusieurs nanomètres) qui permet de créer à la fois des compartiments pour l'incorporation d'enzymes et des canaux pour la diffusion du substrat. Ajoutons à cela que leur structure cristalline aide à stabiliser la conformation

3D des enzymes, augmentant leur stabilité dans des conditions extrêmes. Il est notamment possible de fixer les enzymes de différentes manières (interactions électrostatiques, liaisons hydrogène, ou même liaisons covalentes) sur les nœuds métalliques comme sur les ligands des MOF, grâce à la possibilité d'introduire de nombreuses fonctions chimiques. Sans compter qu'il est également possible d'associer ce type de matériau avec d'autres matériaux plus rigides (silices, nanotubes de carbone, monolithes) pour encore un peu plus moduler leurs propriétés.<sup>315</sup> Notons que ces matériaux sont également mus par un phénomène que l'on qualifie de « *respirabilité* » des MOF,<sup>336,337</sup> qui traduit la présence d'une certaine flexibilité au sein de leur structure, répondant ainsi à un critère de performance pour la catalyse hybride. Cette particularité leur permet notamment de s'adapter structurellement pour l'incorporation d'éléments de dimensions différentes.<sup>309</sup> Il a par exemple été reporté que certains MOF étaient en mesure d'accommoder des enzymes dont la structure est de taille légèrement supérieure à celle de leurs pores,<sup>338</sup> sans que cela ne détruise le matériau, ou entraîne la désactivation de l'enzyme. Bien au contraire, cette contrainte stérique a été démontrée comme aidant à stabiliser les protéines et à augmenter leur recyclabilité. La stabilité dans l'eau et certains milieu tamponnés largement étudiée,<sup>339</sup> et désormais attestée de certaines familles de MOF, en font de plus des matériaux directement compatibles avec la biocatalyse, sans avoir à recourir à des systèmes et des solvants complexes pour leur mise en œuvre. Enfin, la facilité de synthèse et le faible coût de certains d'entre eux les rendent particulièrement accessibles à la communauté scientifique, sans nécessiter d'appareil spécifique ou la commande de produits très spécifiques. On peut d'ailleurs remarquer que la quasi-totalité des exemples présentés ces dernières années vient de groupes chinois, qui ont clairement investi la thématique. En Europe et aux États-Unis, les exemples comme les groupes qui travaillent à l'immobilisation d'enzymes dans et sur des MOF sont beaucoup plus restreints, et l'on pourra citer principalement celui du Pr. Falcaro (Université Technologique de Graz, Autriche),<sup>340-342</sup> du Pr. Farha (Université du Nord-Ouest, États-Unis d'Amérique),<sup>343-346</sup> ou encore de la Dr. Clémence Sicard (Institut Lavoisier de Versailles, ILV),<sup>332,347-349</sup> avec laquelle j'ai récemment entamé une nouvelle collaboration. Pour plus de détail concernant l'utilisation des MOF pour l'immobilisation d'enzymes, je conseille la lecture des revues de Wang *et coll.*,<sup>317</sup> Li *et coll.*,<sup>318</sup> Du *et coll.*,<sup>350</sup> Liang *et coll.*,<sup>341</sup> et de Drout *et coll.* pour une revue plus spécifiquement dédiée à la biocatalyse à base de MOF.<sup>343</sup> Celles-ci font autorité dans le domaine et résument bien la diversité des interactions enzymes-MOF qui ont été développées jusque-là.

Les MOF ont également été décrits à maintes reprises comme supports efficaces pour de nombreux catalyseurs chimiques (Figure 66). De manière générale, les stratégies d'immobilisation des différents types de ces catalyseurs sont identiques aux stratégies citées pour les enzymes (adsorption/liaison covalente à la surface du matériau, coprécipitation/encapsulation, et incorporation au sein des canaux des MOF).<sup>315</sup> À celles-ci s'ajoute la possibilité de réaliser une transmétallation au niveau des centres de coordination, dans le cas de la production de MOF métalliques à activité catalytique. L'équipe de Yaghi a par exemple réalisé jusqu'à l'intégration de 10 métaux divalents différents dans un MOF-74.<sup>351</sup> Les MOF originels sont en effet assez peu décrits tels quels dans le domaine de la catalyse chimique dans la mesure où les métaux utilisés dans leur synthèse n'ont pas ou peu d'activité catalytique.<sup>315</sup> De nombreux travaux décrivent ainsi des MOF modifiés par transmétallation (MixedMetal-MOF, MM-MOF) ayant de très bonnes activités catalytiques.<sup>309</sup> Cela dit, la transmétallation n'est pas un procédé aisé, et les techniques plus conventionnelles conservent tout leur intérêt pour la synthèse de MOF catalytiques. De la même manière que pour les enzymes, l'incorporation de centres catalytiques chimiques au sein des canaux des MOF représente donc une solution très avantageuse, avec des propriétés similaires. Parmi les différents catalyseurs immobilisés suivant cette stratégie, les nanoparticules métalliques (NPM) ont été citées à de nombreuses reprises.<sup>352</sup> Les MOF représentent en effet un bon support pour ces catalyseurs dans la mesure

où ils ont été décrits comme réduisant la tendance des NPM à s'auto-agréger, permettant ainsi de contrôler plus finement leur structure et, de fait, leur activité catalytique, les deux étant intimement liées. Plus encore, des effets de synergie dans le cas où différents NPM étaient incorporés au sein des canaux ont également été décrits.<sup>352</sup> Cependant, ces derniers restent encore très difficiles à comprendre et à expliquer.<sup>309</sup> Je pense que la multiplication des exemples de MMCH combinant enzymes et catalyseurs chimiques devrait nous permettre d'avoir une vision plus globale de ces effets, et de mieux en comprendre la cause. Notamment en profitant de l'essor des méthodologies computationnelles (notamment le *machine learning*), et en les appliquant à un plus grand nombre de données. Là encore des approches de haut débit pourraient être utiles pour générer ce nombre important de données (« *big data* »). Ces MMCH auront ainsi une finalité aussi bien théorique que pratique, avec la compréhension des mécanismes qui régissent les interactions entre les catalyseurs et avec leur support.

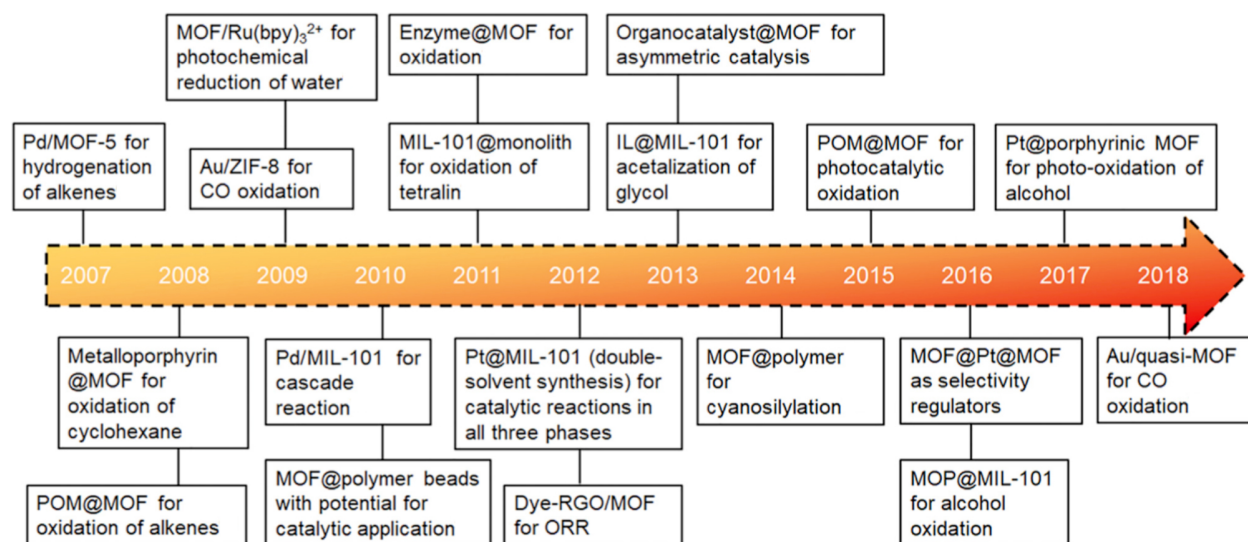


Figure 66 : Frise chronologique retraçant les faits marquants en catalyse à base de MOF.

(Image issue de Chen et Xu)<sup>315</sup> (MOF : metal-organic framework ; POM : polyoxométallate ; bpy : 2,2'-bipyridine ; RGO : reduced graphene oxide ; ORR : oxygen reduction reaction ; IL : ionic liquid ; MOP : metal-organic polyhedral)

La possibilité d'immobiliser à la fois des enzymes et des NPM de manière séparée, combinée à leur bonne stabilité à *pH* neutre, en particulier lors de l'utilisation de centres métalliques avec un degré d'oxydation élevé (proportion de liaisons ligand-métal covalentes plus importante),<sup>353-355</sup> et à leur synthèse dans des conditions douces, font donc des MOF des matériaux très prometteurs pour la réalisation de MMCH. Toutefois, à ce jour, assez peu d'exemples de MMCH basés sur des MOF ont été décrits même si leur nombre tend à augmenter durant ces 5 dernières années, le tout premier exemple ayant été rapporté en 2017.<sup>175</sup> Au total on dénombre à ce jour une douzaine d'exemples de MMCH impliquant un MOF comme matériau d'immobilisation, dont seulement la moitié sont réellement utilisés pour des tandems séquentiels en synthèse. En effet, de la même façon que pour les procédés hybrides plus conventionnels, ce type de MMCH a également été appliqué à la réalisation de tandem cycliques (en l'occurrence pour des DKR),<sup>138,356</sup> ou parallèles pour la régénération du cofacteur de l'enzyme,<sup>190,357</sup> ou de manière encore plus éloignée, pour la conception de capteurs.<sup>144,358</sup> Concernant ce type de MMCH appliqués en synthèse, il est intéressant de constater que, malgré leur faible nombre, deux de ces exemples mettent en jeu des familles qui sont assez peu couramment couplées à des MOF. En plus des classiques lipases<sup>359,360</sup> et glucose oxydase,<sup>175,361</sup> un

exemple décrit ainsi l'utilisation d'une *L*-aminoacide oxydase,<sup>225</sup> et un autre d'une céphalosporinase.<sup>362</sup> Concernant les catalyseurs chimiques, tous les exemples décrivent l'utilisation de métaux de transition, dont du palladium, du platine, du fer, du cobalt et du nickel. Ceux-ci sont soit impliqués dans la formation des clusters polyoxo-métalliques du MOF,<sup>175</sup> soit incorporés sous la forme de sels<sup>362</sup> ou de nanoparticules,<sup>225,360,361</sup> démontrant la diversité du type de catalyseurs chimiques et des méthodes d'immobilisation qu'il est possible d'employer pour ces matériaux. On pourra même citer l'exemple d'un MMCH qui possède 2 types de centres actifs chimiques distinct. Cet exemple, rapporté par Dutta *et coll.*,<sup>359</sup> qui est le tout premier système tricatalytique jamais décrit l'utilisation d'un MOF de type ZIF-67 au cobalt dont la structure a été modifiée lors de sa synthèse par l'utilisation de polyvinylpyrrolidone (PVP) afin d'obtenir des mésopores de taille comprise entre 20 et 40 nm. Ceci a, d'une part, permis l'encapsulation de la lipase A de *Candida antarctica* (CaA), dont les dimensions de 4.2 nm × 5.6 nm × 6.3 nm sont assez élevées et similaires à celles de bon nombre d'enzymes utilisées en biocatalyse comme les transaminases que j'ai décrite par exemple. Les auteurs ont également pu incorporer des nanoparticules de Pd (2,6 ± 0,3 nm), lesquelles ont été incluse dans le matériau au moment de sa cristallisation, après avoir été au préalable séparément synthétisées et coiffées de PVP. Mais ce qui fait la réelle particularité de ce MMCH c'est l'utilisation supplémentaire de certains centres Co<sup>2+</sup> non coordonnés par des ligands organiques, résultant de l'utilisation du PVP et des défauts que celui-ci a provoqué dans la structure cristalline. Le potentiel synthétique de ce MMCH tricatalytique a ainsi pu être illustré en l'appliquant à la formation de nitroalcools (réaction de Henry), catalysée par les sites Co(II) insaturés, suivie de la racémisation de l'énantiomère indésirable catalysée par le Pd, tandis que l'autre énantiomère est en parallèle acylé par la lipase (Figure 67). Ceci prouve comment la structure même des MOF, et particulièrement les centres métalliques qui les composent, peut directement être utilisée pour augmenter le nombre d'activités catalytiques des MMCH. Mais plus encore, en évaluant la performance de leurs catalyseurs, utilisés sous forme isolée ou combinée au sein du MOF, Dutta *et coll.* ont mis en évidence une activité plus importante pour leur MMCH que lorsque les centres catalytiques sont séparés en solution, et ce même s'ils sont également immobilisés sur le matériau. En particulier, le rendement obtenu avec le MMCH combinant les 3 centres catalytiques (86 %) s'est révélé bien supérieur à celui obtenu dans le cas où la CaA et les Pd-NP ont été immobilisées séparément dans le MOF (60 %) et mises en solution de manière concomitante. Cette étude a donc, par là même, permis de prouver la possibilité de créer de véritables effets de synergie (1+1=3) entre les catalyseurs lors de leur co-immobilisation au sein d'un MMCH, intérêt premier de ce nouveau type de catalyseur.

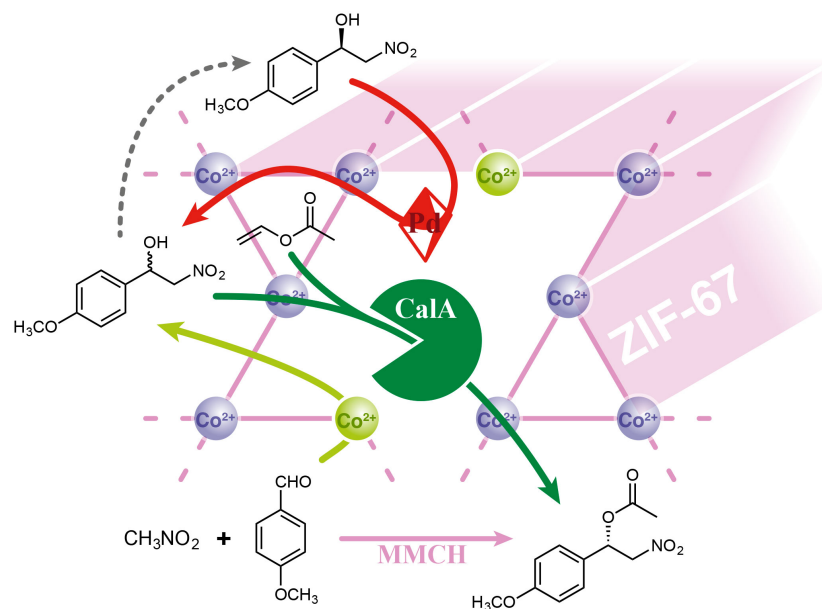


Figure 67 : Synthèse d'acétate de (*S*)-1-(4-méthoxyphényl)-2-nitroéthyle à partir de 4-méthoxybenzaldéhyde, de nitrométhane et d'acétate de vinyle à l'aide d'un MMCH à base de MOF ZIF-67 ( $\text{Co}^{2+}$ ), de la CalA et de nanocristaux de Pd.

(Figure adaptée d'après Dutta et coll.)<sup>359</sup>

### **Synthèse de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique par (co)immobilisation de transaminases et de nanoparticules d'or sur un UiO-66-NH<sub>2</sub>**

Afin de profiter d'effets similaires pour les systèmes hybrides que nous avons précédemment développés, nous avons envisagé la conception d'un MMCH à base de MOF incorporant les transaminases et nanoparticules d'or. Plusieurs options se sont alors présentées pour le choix du matériau, et nous avons commencé par sélectionner l'UiO-66 (*Universitetet i Oslo*) pour nos premiers tests. Ce MOF, synthétisé par association de clusters au zirconium et d'acide téréphtalique, est en effet très largement étudié à l'UCCS pour différentes applications, notamment par les Pr. Thierry Loiseau et Pr. Christophe Volkringer qui m'ont aidé pour le début de ce projet, nous offrant un accès facilité à sa synthèse ainsi qu'à sa caractérisation. Ajoutons que le faible coût des réactifs associés le rend également compatible avec des approches à haut débit, notamment pour la synthèse future des MMCH, et que sa stabilité dans l'eau en fait un matériau prometteur pour des applications en biocatalyse. Ce MOF a, à ce titre, été utilisé récemment pour l'immobilisation d'enzymes,<sup>320,190,328,363</sup> et notamment pour une  $\omega$ -transaminase provenant de *Bacillus megaterium* en 2022, même si aucune de ces études n'étaient parues lors que nous avons débuté ce projet. En revanche, et de manière plus intéressante, l'UiO-66 avait peu avant été employé pour la conception d'un des MMCH précédemment décrit, proposé par Wu *et coll.*,<sup>225</sup> qui combine une *L*-aminoacide oxydase (*L*-AAO) et des nanoparticules de platine. Les auteurs ont ainsi réussi à obtenir un système fonctionnel et efficace la synthèse d'acide indole-3-pyruvique à partir de tryptophane, permettant, grâce au platine, d'à la fois de régénérer le cofacteur de la *L*-AAO et d'éliminer l' $\text{H}_2\text{O}_2$  qui entraînait jusque-là une dégradation du produit de la réaction en acide indole-3-acétique. Une des limitations que l'on peut cependant relever au niveau de ce système provient de l'immobilisation de l'enzyme en surface du matériau, les auteurs ayant noté près de 15 % de relargage de cette dernière, phénomène d'autant plus important que les deux n'étaient liés que par des interactions électrostatiques relativement faibles et des liaisons hydrogènes.

L'UiO-66 présente en effet pour principal inconvénient une taille de pores réduite (5,2 Å), lesquels ne permettent en conséquence pas d'incorporer des enzymes de plusieurs centaines d'acides aminés en son sein, telles que la L-AAO ou encore nos transaminases. A titre d'exemple, la dimension du dimère actif de la Cv-TA est d'environ 66 x 66 x 97 Å (Figure 68).

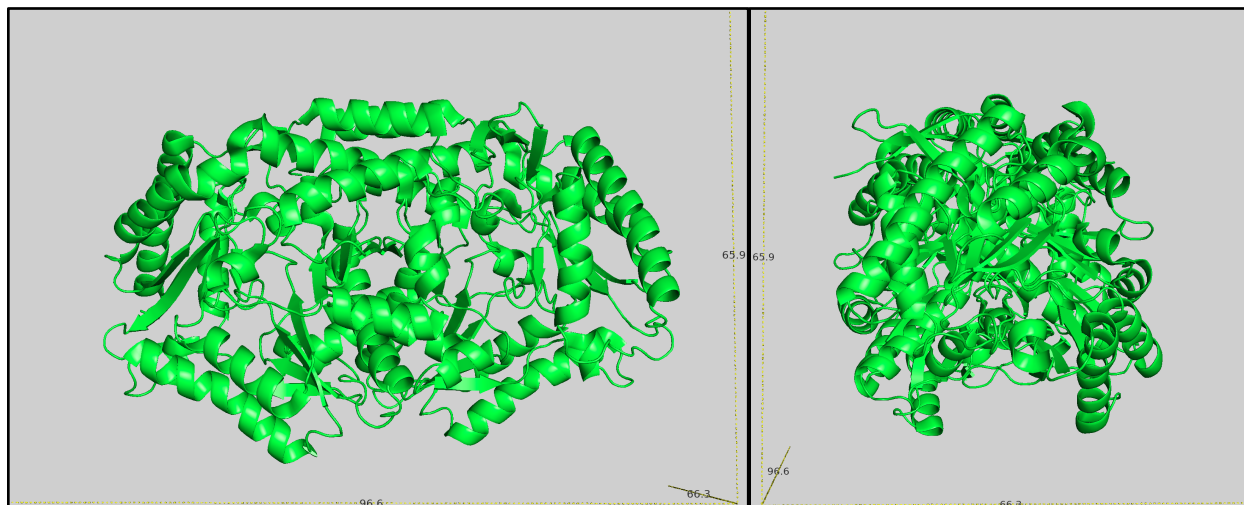


Figure 68 : Dimensions (en Å) de la *minimal bounding box* calculée pour la Cv-TA à partir du fichier PDB (*protein data bank*) 4ba4 avec l'aide du logiciel [pyMOL](#) et du script [Draw Protein Dimensions.py](#).

Aussi, de la même façon que dans l'étude présentée par Wu *et coll.*, nous nous sommes cantonnés dans un premier temps à une immobilisation de nos enzymes en surface. En revanche, et contrairement à cette dernière, nous avons choisi d'opter pour une immobilisation de type covalent afin de limiter le relargage. Pour cela nous avons sélectionné la version de l'UiO-66 substitué par des groupements amino sur les ligands. L'UiO-66-NH<sub>2</sub> peut en effet être très facilement synthétisé de la même façon que l'UiO-66, simplement en remplaçant l'acide téréphtalique par l'acide 2-aminotéréphtalique (Figure 69).

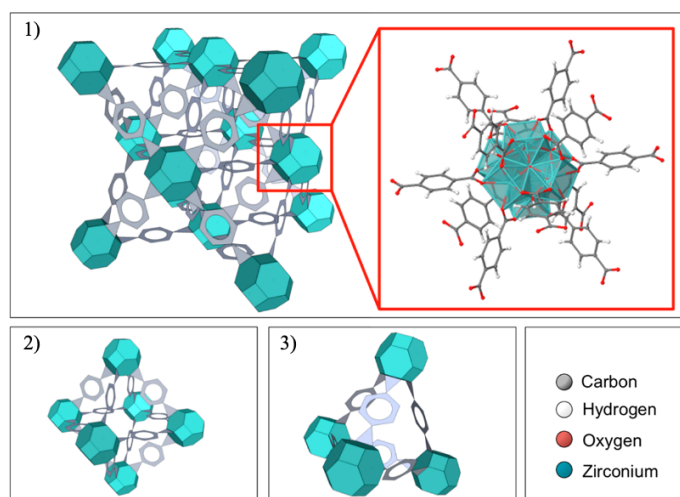


Figure 69 : Représentation de la structure de l'UiO-66. 1) La structure cubique face-centrée de l'UiO-66 composée du nœud métallique (turquoise) et du ligand (gris) avec une représentation atomique du cluster polyoxo-métallique et des 12 ligands d'acide téréphtalique connectées. 2) Le nœud et la structure du ligand composant la cage de 12 Å de l'UiO-66. (C) Le nœud et la structure du ligand composant la cage de 7,5 Å.

(Illustration issue de Winarta *et coll.*)<sup>364</sup>

L'intérêt de ces groupements amino en surface du matériau est qu'ils peuvent servir de point d'encrage pour l'enzyme à l'aide de glutaraldéhyde, lequel étant alors en mesure de former une liaison aldimine secondaire stable par condensation avec ces derniers, ainsi qu'avec les acides aminés de l'enzyme portant des chaînes latérales aminées comme la lysine.<sup>365</sup> Cette approche n'est certes pas idéale pour les transaminases dans la mesure où leur mécanisme repose justement sur la présence d'une lysine catalytique au sein du site actif, laquelle pouvant alors être bloquée lors de l'étape d'immobilisation. Cependant, nous avons tenté de limiter cet empoisonnement en pré-saturant l'enzyme avec du PLP lors de nos essais, lequel se lie également de manière covalente à la lysine catalytique, afin de compter sur sa forte affinité pour l'enzyme et de s'en servir comme un groupement protecteur. Ajoutons que cette méthode d'immobilisation avait également déjà été utilisée avec succès pour les transaminases à plusieurs reprises.<sup>366-368</sup>

Le matériau sélectionné, nous avons donc procédé à sa synthèse de manière conventionnelle, tel que conseillé par Thierry Loiseau et Christophe Volkringer. La structure des MOF obtenus a été confirmée par diffraction aux rayons X, ainsi que leur composition grâce à la fluorescence X et analyse élémentaire. Suite à cela nous avons effectué plusieurs tentatives d'immobilisation des transaminases (*Cv-TA* et *Bm-TA*), en faisant notamment varier la concentration en glutaraldéhyde, enzyme et en MOF, et avons ensuite évalué l'activité du nouveau biomatériau formé pour une réaction témoin. Bien que celle-ci se soit montrée inférieure à celle de l'enzyme libre dans tous les cas, elle s'est montrée largement suffisante pour effectuer la transamination du HMF comme réalisée dans notre procédé hybride pour la synthèse de l'AMFC, avec > 99 % de conversion en moins de 4 h à 10 mM en substrat et 1 mg de Ta/UiO-66-NH<sub>2</sub> dans 1 mL de milieu réactionnel. Nous avons ensuite cherché à voir si le même matériau pouvait également servir pour l'utilisation de nos nanoparticules métalliques. L'or ayant montré la meilleure activité jusque-là pour l'oxydation du HMFA, nous avons choisi de nous concentrer en priorité une fois encore sur ce métal. Les nanoparticules d'or ont alors été déposées en surface du matériau (sans enzyme dans un premier temps), par mélange d'une solution colloïdale d'Au<sub>PVA</sub> avec l'UiO-66-NH<sub>2</sub> selon la méthode utilisée jusque-là pour la synthèse de nos autres catalyseurs métalliques. Une fois lavé et séché, le Au<sub>PVA</sub>/UiO-66-NH<sub>2</sub> (2 % m/m) a été évalué pour sa capacité à oxyder le HMFA. À notre grande surprise, il a fait preuve d'une des meilleures activités que nous avons jusque-là pu observer, avec 68 % de conversion du HMFA en 48 h et une production de 51% en AMFC et de 16 % en AMFA. Ceci est d'autant plus étonnant que nous nous attendions à ce que les groupements amino présents en surface puissent interférer avec l'activité des nanoparticules d'or. Ces premiers essais en font donc, à ce jour, un des catalyseurs les plus prometteurs en notre possession pour la conversion du HMF en AMFC en *one-pot/one-step* (Figure 70).

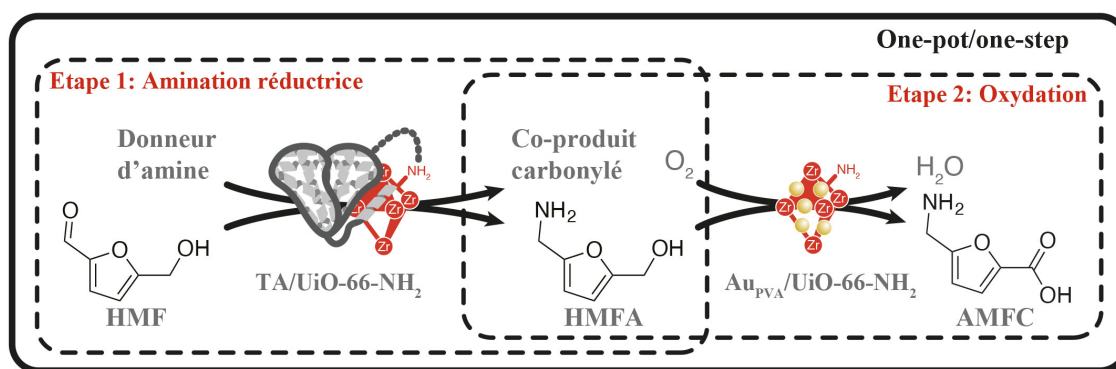


Figure 70 : Procédé catalytique hybride en *one-pot/one-step* pour la synthèse de l'acide 5-aminométhyl-2-furancarboxylique (AMFC) à partir du 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) combinant successivement une transaminase et des nanoparticules d'or immobilisées séparément sur un MOF de type UiO-66-NH<sub>2</sub>.

Nous avons d'ailleurs déjà pu confirmer l'efficacité des  $\text{Au}_{\text{PVA}}/\text{UiO-66-NH}_2$  en réalisant le même procédé en one-pot/one-step qu'avec le  $\text{Au}_{\text{PVA}}/\text{TiO}_2$ . Celui-ci nous a ainsi permis d'obtenir un rendement de 17 % en AMFC, avec une conversion totale du HMF en HMFA, l'étape limitante étant donc l'oxydation chimique comme dans le cas de l'utilisation du dioxyde de titane comme support pour les nanoparticules. Cependant, malgré ce rendement pour l'instant modeste, le gros avantage de ce procédé est que, bien qu'il soit en 1P1S, l'étape catalysée par les nanoparticules possède une cinétique plus lente que la transamination. Ceci permet de rendre impossible la formation du FDCA, tout le HMF étant très rapidement convertit en HMFA, l'oxydation maximale duquel conduisant obligatoirement à l'obtention d'AMFC. Contrairement aux précédents procédés en 1P2S, il n'est donc plus obligatoire d'ajouter l'enzyme à un moment précis, où la concentration en intermédiaire est la plus élevée.

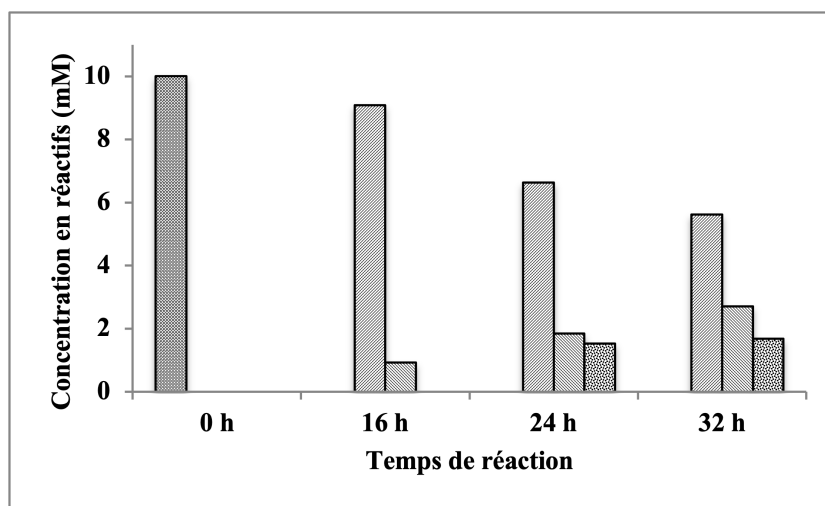


Figure 71 : Concentrations en HMF, HMFA, AMFA, et AMFC mesurées tout au long de la réaction hybride en one-pot/one-step combinant la *Bm*-TA/EziG™ OPAL et l' $\text{Au}_{\text{PVA}}/\text{UiO-66-NH}_2$ .

Il convient tout de même de noter que l' $\text{Au}_{\text{PVA}}/\text{UiO-66-NH}_2$  fait preuve d'un important relargage au niveau du métal, ce qui peut expliquer le ralentissement de la réaction d'oxydation au cours du procédé, et qui n'est pas tout à fait étonnant dans la mesure où l'or n'a été immobilisé qu'en surface du MOF. Un axe d'amélioration sera donc de prochainement réaliser l'incorporation des nanoparticules au sein des pores du matériau, de la même manière que décrit dans l'étude de Wu *et coll.*, afin également de les protéger de l'enzyme et inversement, comme planifié à l'origine pour la conception du MMCH. Cette étape ne devrait d'ailleurs pas poser de gros problème dans la mesure où notre méthode de synthèse des nanoparticules d'or nous permet d'atteindre des tailles avoisinant les 3 nm. Il conviendra tout de même de bien caractériser l'activité de ces dernières une fois immobilisées, notamment à cause du risque d'une diffusion limitée des substrats et produits au sein du matériau. Aussi j'ai bon espoir que nous puissions assez rapidement espérer obtenir notre premier MMCH fonctionnel de type TA/ $\text{Au}_{\text{PVA}}@/\text{UiO-66-NH}_2$  (Figure 72).



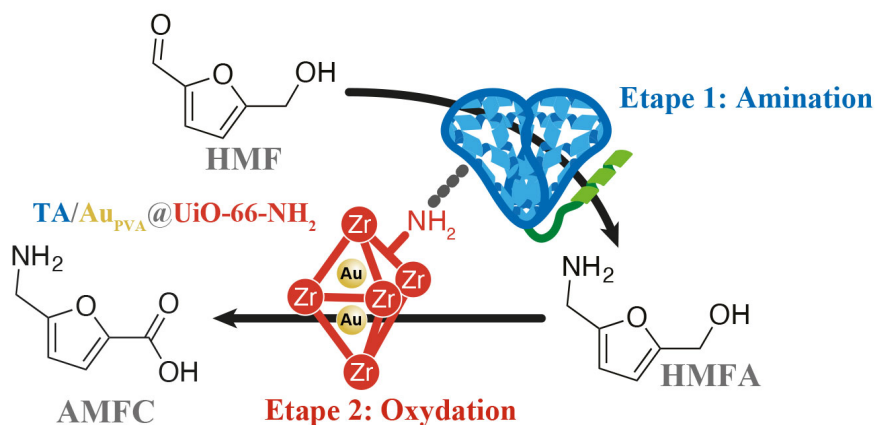


Figure 72 : Procédé catalytique pour la conversion directe du HMF en AMFC à l'aide d'un matériau multi-catalytique hybride de type TA/Au<sub>pVA</sub>@UiO-66-NH<sub>2</sub>.

### Synthèse à haut débit de l'UiO-66 et de ses dérivés

En parallèle de cette première étude autour de l'immobilisation des transaminases et nanoparticules d'or sur l'UiO-66-NH<sub>2</sub>, nous avons voulu voir si nous pouvions réaliser la synthèse de cette famille de MOF à haut débit, en utilisant les robots de la plateforme REALCAT. L'objectif de cette étude était double : d'une part nous voulions voir si la transposition de la synthèse du MOF en système 100 % automatisé était possible, afin d'envisager la production de nos MMCH directement à l'aide du robot. D'autre part nous désirions voir si nous pouvions facilement faire varier les paramètres de cette synthèse, bien calibrée, afin d'envisager la production de matériaux avec des propriétés et structures légèrement différentes, notamment en vue de la génération d'un grand nombre de combinaisons enzyme/MOF pour alimenter les algorithmes de prédiction de biomatériaux que nous allons développer, tel que j'aurai l'occasion de le détailler dans la partie de ce mémoire traitant de mon projet. Ainsi, dans le cadre du stage de Collins Erhianoh, avons voulu moduler la synthèse de l'UiO-66 et de l'UiO-66-NH<sub>2</sub> en faisant varier 3 paramètres en même temps : le modulateur, la température et le solvant. Les modulateurs sont des d'acides organiques ou non, et plus généralement de l'acide formique dans le cas de l'UiO-66-NH<sub>2</sub>, qui sont ajouté lors de la synthèse du MOF et qui sont essentiels à l'obtention d'une structure cristalline car ils empêchent l'assemblage de se faire de manière trop rapide et désorganisée. Notons qu'ils peuvent également être responsables de la création de défauts, plus ou moins nombreux et volumineux au sein de la structure du MOF, lesquels pourraient être utiles pour l'incorporation d'enzymes comme dans le cas du MMCH proposé par Dutta *et coll.*. Pour ce criblage nous avons ainsi choisi de tester la synthèse des UiO-66 et UiO-66-NH<sub>2</sub> sans modulateur, ainsi qu'en présence d'acide formique (FA), acétique (AA) et chloridrique (HCl). Cette première partie de l'étude a été réalisée sur un premier robot, le Catimpreg, conçu par la société Chemspeed (Figure 73). Ce robot est en mesure de manipuler des liquides, comme les Biomek que j'ai déjà mentionnés, mais également de distribuer des solides avec une précision au milligramme, et de réaliser des opérations de chauffage et refroidissement, sous pression et atmosphère inerte, ainsi que des étapes de filtration, lesquelles sont requises pour le nettoyage des MOF après leur synthèse.



Figure 73 : Photo du robot Catimpreg de la plateforme REALCAT, sur laquelle figure la Dr. Svetlana Heyte (UCCS), ingénieure de recherche en charge de la partie chimie de la plateforme REALCAT.  
(Photo par Cyril Fresillon, CNRS)

Nous avons ainsi utilisé les 48 réacteurs du robot pour réaliser les synthèses de nos UiO-66 et UiO-66-NH<sub>2</sub> en absence ou en présence des différents modulateurs, en triplicas techniques. En résultat, toutes les synthèses ont mené à l'obtention d'une poudre fine après filtration et lavage (Figure 74).

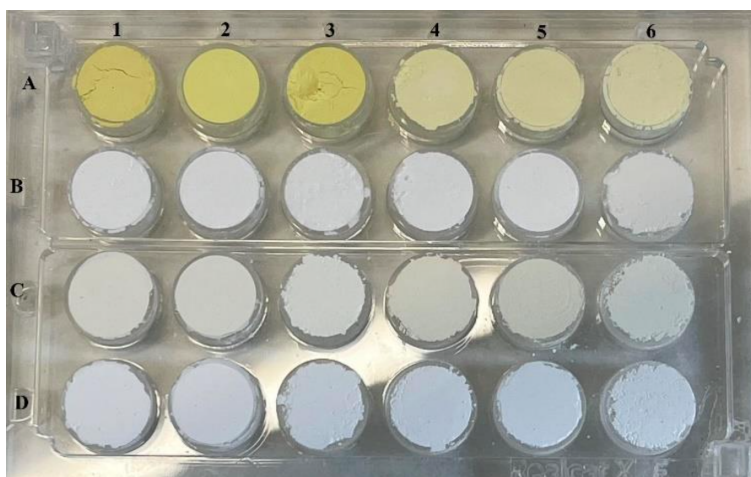


Figure 74 : Poudres obtenues pour les triplicas des synthèses de l'UiO-66-NH<sub>2</sub> et de l'UiO-66, avec aucun modulateur (A1-A3 et B1-B3 respectivement), de l'acide formique (C1-C3 et D1-D3 respectivement), de l'acide acétique (A4-A6 et B4-B6 respectivement), et de l'acide chloridrique (C4-C6 et D4-D6 respectivement)

Une bonne cristallinité a pu être observée, avec les pics correspondants aux angles attendus, pour toutes les synthèses en présence des modulateurs lors de la caractérisation par diffraction aux rayons X.<sup>369,370</sup> Des diffractogrammes légèrement meilleurs ont tout de même été obtenus avec l'acide formique, comme escompté (Figure 75).

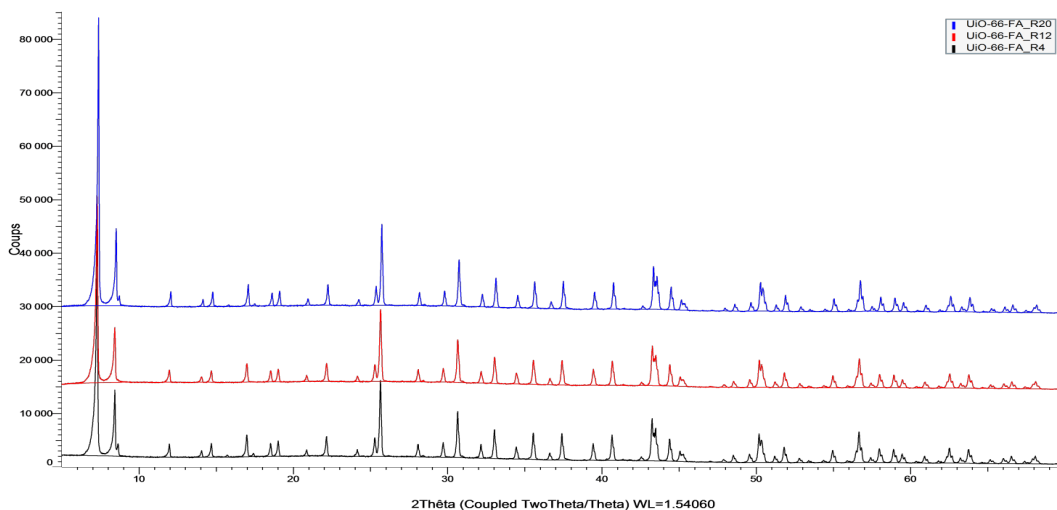


Figure 75 : Diffratogrammes obtenus pour les 3 répliques de la synthèse de l'UiO-66 en présence d'acide formique utilisé comme modulateur à l'aide du robot Catimpreg de la plateforme REALCAT.

De la même façon, et comme attendu, la synthèse de l'UiO-66-NH<sub>2</sub> en absence de modulateur a conduit à l'obtention d'un solide amorphe. De manière plus étonnante, l'UiO-66 synthétisé dans la même condition a gardé sa cristallinité. Cela dit, après discussion avec mes collègues du domaine, il semblerait que l'UiO-66-NH<sub>2</sub> soit plus sensible à la concentration en modulateurs. Mais également qu'une partie du diméthyleformamide (DMF), utilisé comme solvant pour la synthèse, ait été dégradée par oxydation avant ou durant celle-ci, conduisant à la formation de faibles concentrations en acide formique comme cela a déjà pu être observé. J'en profite également pour préciser que nous avons bénéficié pour la caractérisation des MOF criblés du nouveau support pour échantillons que j'avais aidé à concevoir avec la Dr. Joëlle Thuriot (UCCS), et qui permet d'analyser des poudres en diffractométrie à rayons X, fluorescence X, infrarouge et spectroscopie RAMAN sans avoir à re préparer de nouveaux échantillons ou même à les changer de supports. Ce nouveau dispositif a d'ailleurs fait l'objet d'une publication dédiée dans le journal *RSC Advances* en 2018.<sup>371</sup> Celle-ci sera notamment très utile dans le cadre de mon projet de recherche, nous permettant de considérablement réduire le temps de caractérisation des MOF que nous produisons. Enfin, l'analyse BET des MOF cristallins nous a permis de déterminer des surfaces spécifiques et des tailles et volumes de pores conformes à la littérature, avec par exemple 1132 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> dans le cas de l'UiO-66 avec de l'acide formique, et un volume d'absorption de 0,69 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>, contre 1673 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> et 0,68 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup> en théorie.<sup>372</sup>

Nous nous sommes ensuite intéressés à la modulation de la température de synthèse du matériau afin d'évaluer son importance pour l'obtention de la structure cristalline du MOF, mais également à quantifier les limites de notre robot en termes de chauffage, notamment en présence d'acides. Pour cela nous avons testé deux températures, 120 °C et 170 °C, la première étant la température habituelle utilisée pour la synthèse. Dans le même temps nous avons également fait varier le solvant utilisé, la synthèse de l'UiO-66 et UiO-66-NH<sub>2</sub> étant habituellement réalisée dans le DMF, et ce dernier étant toxique et en général assez peu compatible avec les enzymes. L'idée serait ici de voir si une synthèse dans un mélange 50/50 : H<sub>2</sub>O/DMF serait envisageable, voir 100 % dans l'eau, afin d'envisager l'obtention d'un MOF nécessitant moins d'étapes de lavage avant une utilisation en biocatalyse sans risquer de contaminer le milieu. Pour cette dernière condition, nous avons également dû tester en même temps l'utilisation du téréphthalate de sodium comme précurseur, l'acide téréphthalique n'étant pas soluble dans le milieu aqueux au pH de la réaction, maintenu très acide à cause des modulateurs. Pour cette série de synthèses nous avons

utilisé cette fois la plateforme Autoplant de REALCAT, également commercialisée par Chemspeed, et qui dispose de 8 autoclaves en parallèle, capables de monter jusque 200 °C et 10 bars de pression.



Figure 76 : Photo du robot Autoplant de la plateforme REALCAT, sur laquelle figure la Dr. Svetlana Heyte (UCCS), ingénieure de recherche en charge de la partie chimie de la plateforme REALCAT.  
(Photo par Cyril Fresillon, CNRS)

En résultat de ce criblage, réalisé avec de l'acide formique comme modulateur d'après nos résultats précédents, nous avons également pu obtenir une poudre pour l'ensemble des synthèses à 120 °C. A 170 °C, nous avons réussi à obtenir l'UiO-66 dans les différents solvants et mélanges, mais pas l'UiO-66-NH<sub>2</sub> dans les milieux aqueux, son ligand se décomposant visiblement dans ces conditions. Notons que dans le cas du mélange H<sub>2</sub>O/DMF, un tout petit peu de poudre a tout de même pu être obtenu, mais elle ne présentait aucune structure cristalline. Au niveau des diffractogrammes des poudres présentant une bonne cristallinité, nous avons pu remarquer une différence d'intensité de certains pics suivant le solvant utilisé, avec notamment une augmentation des pics liés au ligand en présence de l'eau. Entre 120 °C et 170 °C, aucune réelle différence n'a pu être observée au niveau de la cristallinité. L'utilisation du téréphtalate de sodium a également permis d'aboutir à la synthèse de l'UiO-66, avec là encore quelques variations au niveau de l'intensité des pics. Le résultat qui fut le plus intéressant fut celui obtenu lors de la synthèse de l'UiO-66 dans l'eau à 170 °C. Pour celui-ci, le diffractogramme a révélé l'apparition d'une anomalie de sa structure cristalline, des pics correspondant à la forme « *hexagonal close packing* » (hcp) étant en effet apparus. En temps normal, l'UiO-66 présente une structure cubique face-centrée (Figure 69). Ceci concorde avec certaines études qui ont effectivement montré que l'augmentation de la concentration en eau pouvait aboutir à l'apparition de cette forme.<sup>364,373</sup> L'intérêt de la forme hcp est qu'elle permet l'apparition de mésopores au sein du matériau, ce qui pourrait être intéressant pour l'encapsulation d'enzymes ou au moins de nanoparticules métalliques de taille plus importante. En effet, il semblerait que cette forme puisse supporter des défauts de liaisons manquantes à des concentrations plus élevées, compensées par l'introduction de formates, d'eau et d'hydroxydes.<sup>373</sup> En outre, il est visiblement possible d'exploiter l'apparition de cette forme pour synthétiser directement des nanofeuillets bidimensionnels d'UiO-66 avec une topologie hexagonale. Pour tenter de creuser cette piste, de nouveaux criblages sont en cours, en faisant notamment varier la concentration en ligand, en modulateur et en eau, ainsi qu'en remplaçant le ZrCl<sub>4</sub> par du

ZrOCl<sub>2</sub>.8H<sub>2</sub>O. Les premiers résultats sont encourageants, et tendent à montrer que 1) il est possible d'effectivement synthétiser l'UiO-66 sous forme hcp, et que 2) l'utilisation des précurseurs insolubles dans l'eau en combinaison avec une forte concentration en acide tendent également à favoriser l'apparition de cette forme, comme décrit précédemment.<sup>373</sup> Cependant ceux-ci doivent encore être consolidés.

Enfin, nous avons également réalisé une analyse par microscopie électronique à balayage de nos UiO-66 et UiO-66-NH<sub>2</sub>. Pour les synthèses sans modulateur, comme pressenti lors de l'analyse par DRX, aucune structure régulière bien définie n'a pu être obtenue pour l'UiO-66 et l'UiO-66-NH<sub>2</sub>. Dans le cas de l'utilisation de l'acide formique, de belles structures octaédriques ont pu être observées pour l'UiO-66 (Figure 77), alors celles obtenues pour l'UiO-66-NH<sub>2</sub> se sont montrées de taille bien inférieure, plus proche de celles en l'absence de modulateur, quoi que mieux résolues.

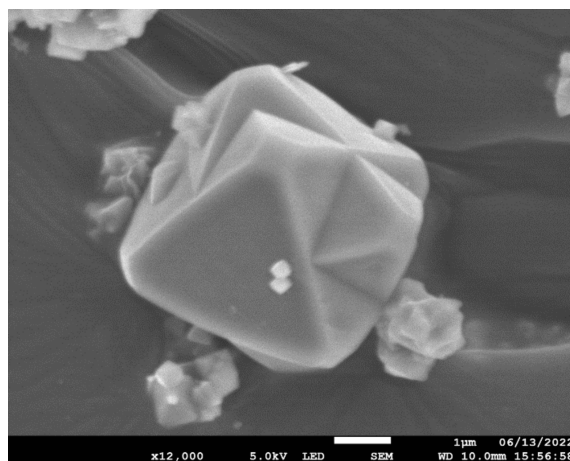


Figure 77 : Image prise au microscope électronique à balayage de l'UiO-66 synthétisé à l'aide du robot Catimreg en présence d'acide formique comme modulateur.

L'UiO-66 synthétisé en présence d'HCl a également conduit à l'apparition d'une structure cristalline de petite taille, de forme similaire, avec une faible cristallinité. Enfin l'acide acétique a quant à lui conduit à l'apparition d'un agrégat plat interconnecté de nanofeuillets. Dans l'eau, l'UiO-66 obtenu à 120 °C a montré une morphologie avec une taille et une forme irrégulières, et des espaces entre les particules, alors que celui obtenu à 170 °C a montré une cristallinité légèrement plus élevée, avec un enchevêtrement au niveau de la croissance des cristaux. Rappelons que le défaut hcp a été observé pour la première fois avec le diffractogramme correspondant à cette synthèse. D'ailleurs, lors de nos essais préliminaires, l'augmentation de la concentration en acide nous a permis d'obtenir une bien meilleure cristallinité, avec l'apparition beaucoup plus nette de ces aiguilles interconnectées (Figure 78). Ces structures concordent d'ailleurs avec la publication de Firth *et coll.*, lesquels se sont également intéressés à l'obtention de la forme hcp du MOF.<sup>373</sup>

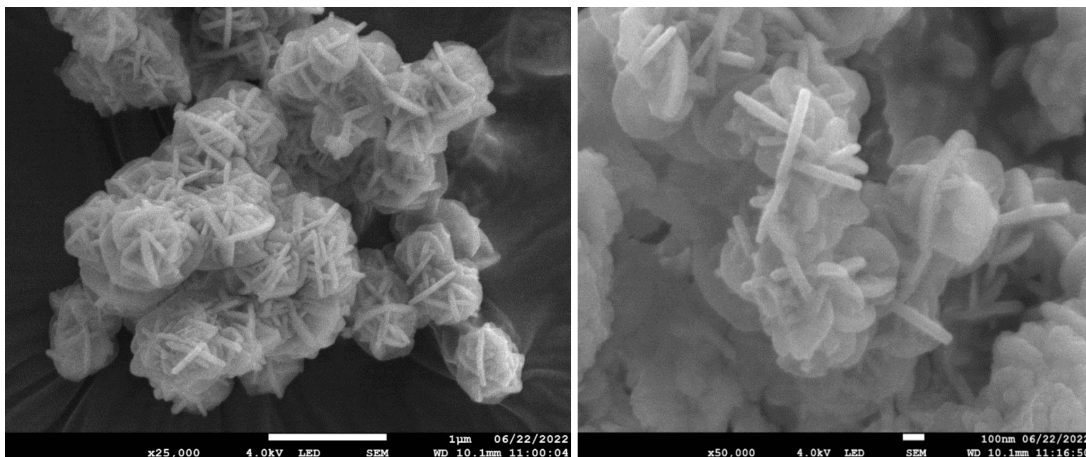


Figure 78 : Images prise au microscope électronique à balayage de l'UiO-66 sous forme hcp obtenue à partir d'une synthèse dans l'eau, avec un rapport acide formique/solvant = 0,2, à 120 °C (gauche) et 170 °C (droite).

En conclusion, ces premiers criblages nous ont permis de confirmer la possibilité d'utiliser efficacement le Catimpreg et l'Autoplant pour la synthèse automatisée de MOF, lesquels seront particulièrement utiles pour le criblage du large panel de matériaux de cette famille que je compte réaliser prochainement dans le cadre de mon projet de recherche.

**Résumé de ma contribution :** En droite continuité avec les procédés hybrides autour des furfurylamines, les travaux préliminaires sur la conception de nouveaux MMCH à partir de MOF sont directement issus de mon projet de recherche et constituent d'ailleurs le cœur de celui-ci. Les travaux détaillés ici ont également été menés en grande partie durant la thèse d'Antoine Lancien, ainsi que dans le cadre de plusieurs stages qui ont suivi, mais désireux de me former à la synthèse de ces matériaux, j'ai également réalisé moi-même plusieurs des expérimentations qui ont menées à ces résultats. De manière annexe, à travers cette thématique, j'ai également pu assimiler les compétences de base en techniques de caractérisation des solides, avec la manipulation des différents appareils de la partie chimie de REALCAT, ainsi que la préparation des échantillons pour la microscopie électronique à balayage.

**Lien avec mon projet de recherche :**  
 Comme je l'ai précisé précédemment, la catalyse hybride et plus particulièrement la conception de nouveaux MMCH constituera le cœur de mon projet de recherche. L'ensemble de ces études m'a tout d'abord permis de me familiariser avec tous les concepts qui régissent la catalyse hybride, domaine à l'interface de nombreuses disciplines. Grâce à cela j'ai notamment pu mettre un pied en catalyse hétérogène, ainsi qu'en science des matériaux avec la synthèse des MOF. Bien sûr je ne compte pas devenir un expert de chacun de ces domaines, ma compétence étant clairement plutôt située autour de l'enzymologie. Mais ces premières expériences m'ont tout de même permis de me confronter à certaines des difficultés inhérentes à ces domaines, et surtout d'apprendre le langage qui leur est associé, ce qui me permettra de développer beaucoup plus efficacement de nouvelles collaborations pour le développement de ma recherche. A ce titre, j'ai récemment commencé à collaborer avec Dr. Clémence Sicard (ILV), dont les compétences sont très complémentaires aux miennes dans la mesure où elle s'intéresse au même sujet mais venant du côté de la chimie des matériaux.

Sur le plan plus technique, ces premiers projets m'ont permis de me constituer un portefeuille de réactions hybrides modèles avec lesquelles expérimenter, en particulier pour la conception des MMCH, sans pour autant que les molécules qu'elles synthétisent soient inintéressantes sur le volet valorisation de la biomasse. Les furfurylamines feront d'ailleurs partie des premières molécules que je compte fonctionnaliser et appliquer dans différents domaines, à commencer par celui de la synthèse de polymères, avec l'aide du Pr. Philippe Zinc (UCCS), ou encore celui des surfactants, avec la Dr. Muriel Billamboz (JUNIA-HEI) et la Pr. Véronique Rataj (UCCS). J'ai également désormais à disposition une première famille de MOF que je maîtrise pour la synthèse des nouveaux matériaux hybride, laquelle sera complétée sous peu avec d'autres familles de MOF, dont celle des NU-100x, qui sont beaucoup plus adaptées à l'encapsulation d'enzymes au sein de leurs pores. La synthèse de ces derniers est d'ailleurs actuellement en cours à travers une collaboration que j'entretiens depuis 2 ans avec le Dr. Till Bousquet, visant notamment la synthèse des ligands organiques de ces derniers que je détaillerai succinctement dans la partie de ce mémoire traitant de mon projet.

#### ***Axe 4 : Conception d'outils informatique et d'algorithmes de machine learning pour la prédiction de l'activité d'enzymes***

Laboratoires :	Unité de Catalyse et Chimie du Solide (UCCS)
Collaborateur·ice·s principaux·ales	Dr. Tao Jiang (E2P2L) Dr. Mark Dörr (Université de Greifswald) Dr. Stefan Born (Université Technique de Berlin) Pr. Pascal Yim (CRISTAL)
Communications orales :	1 internationale

Ce 4<sup>ème</sup> axe de mon mémoire se concentrera sur les récents travaux que nous avons menés autour de la prédiction de l'activité de transaminases à partir des données des criblages générées lors des criblages de la thématique 1.1. Démarré en premier lieu comme un projet annexe, cette thématique vient désormais compléter ma recherche en catalyse hybride. Je suis en effet convaincu que l'une des approches qui permettra de sélectionner plus efficacement les catalyseurs et les matériaux à combiner réside en l'utilisation de l'intelligence artificielle, laquelle connaît ces dernières années une véritable révolution, en particulier dans les sciences biologiques et chimiques. D'autant plus que, rentrant en très bonne adéquation avec les approches à haut débit, la programmation d'algorithmes de ce type a très tôt piqué ma curiosité afin d'exploiter plus efficacement les données générées, ce qui est en parfaite continuité avec les premières interfaces informatiques que j'ai eu l'occasion de développer dans les axes 1 et 2. Aussi dans cet axe je présenterai nos premiers essais sur la prédiction d'activité de transaminases à partir des jeux de données que nous avons pu obtenir dans l'axe 1 lors des criblages des banques TAM. Avant cela je me permettrai d'introduire l'utilité du *machine learning* pour ce type de prédiction en donnant un peu de contexte sur son historique en catalyse et son utilisation actuelle, avec quelques exemples et grandes tendances. Je tenterai de vulgariser au maximum les concepts qui sont derrière l'utilisation de ces modèles, mais ne voulant pas faire une trop longue introduction et n'étant moi-même pas encore parfaitement à l'aise avec toutes ces notions, j'en simplifierai certaines, quitte à les rendre un peu moins précises, et passerai sur celles qui ne me semblent pas essentielles pour comprendre le propos général.

#### **Thématique 4.1 : utilisation du *machine learning* au service de la prédiction de l'activité d'enzymes**

##### ***Introduction : utilité du machine learning pour la prédiction de biocatalyseurs***

La catalyse demeure une science encore largement empirique. Que ce soit en chimie ou en biologie, ceci s'explique par la très grande complexité des interactions existant entre les catalyseurs, les substrats et produits qu'ils transforment, ainsi que leur environnement (conditions réactionnelles). Il est en effet toujours difficile de pouvoir prédire *a priori* la réactivité d'un catalyseur pour un substrat donné, et encore plus de générer un nouveau catalyseur présentant les propriétés (activité, stabilité, etc.) recherchées. En complément à l'approche « essai-erreur » encore très majoritaire, les scientifiques se sont dès le siècle dernier tournés vers les stratégies à haut-débit permettant de paralléliser les tests,<sup>374,375</sup> tout en les automatisant, ce qui permet aujourd'hui de réaliser un gain considérable de temps, de moyens et de ressources. La plateforme REALCAT est d'ailleurs née en réponse à cette demande.<sup>376</sup> Les technologies à haut débit font désormais partie intégrante des stratégies de conception des catalyseurs,<sup>377-382</sup> et sont disponibles de manière assez universelle, qu'il s'agisse de simples lecteurs de plaques de paillasse, jusqu'aux systèmes plus avancés comme les *lab on-a-chip* de type microfluidique. Ces derniers représentent d'ailleurs sûrement ce qui se fait de mieux dans le domaine à l'heure actuelle et ont été appliqués au criblage aussi bien de catalyseurs chimiques<sup>377,383</sup> et biologiques,<sup>384-387</sup> qu'à celui de matériaux,<sup>388,389</sup> avec des débits



dépassant tout ce qui a été réalisé jusque-là, certains criblages réalisant jusqu'à  $10^5$  analyses par jour.<sup>390</sup> Néanmoins, ces approches ne changent fondamentalement pas la philosophie derrière la conception de nouveaux catalyseurs, les cycles d'essai-erreur étant juste beaucoup plus nombreux et réduits en temps et en coûts par échantillon. A ceci s'ajoute le fait que, malgré la miniaturisation qui a accompagné le développement des technologies de criblage robotisé à haut débit, le nombre de tests réalisés par la communauté scientifique a augmenté de façon exponentielle, et avec lui le coût en matériau de départ (réactifs, consommables, etc.), la réduction individuelle du coût associée à chaque test ne permettant plus de compenser cette augmentation. En biocatalyse, ce fort accroissement fait notamment réponse à la réduction drastique du coût technique et financier du séquençage de l'ADN, lequel a permis l'avènement des métagénomiques et des banques de données internationales, donnant accès à un panel vertigineux de potentielles nouvelles enzymes. Sans compter également l'accélération des outils pour l'ingénierie enzymatique, là encore aidée par le séquençage toujours plus rapide d'ADN. A titre d'exemple, il est aujourd'hui possible de séquencer plusieurs millions de séquences (jusqu'à 15000 paires de bases par fragment,  $420 \text{ bases} \cdot \text{seconde}^{-1}$  pendant 72 h), produites par répllication *in vitro* d'ADN (*polymerase chain reaction*, PCR), en quelques heures avec un appareil qui tient dans la main comme le MinION, lequel n'ayant besoin que de quelques microlitres d'échantillons, et coûtant moins de 1000 € par analyse à faire fonctionner.

Ainsi, il devient à présent évident que le haut débit seul ne permettra pas d'explorer tout le panel de catalyseurs qui s'offre aux chercheurs, sans compter la possibilité de les combiner les uns avec les autres comme dans le cas de la catalyse hybride ou plus encore de la conception de MMCH, qui ajoutent le choix des matériaux. Là encore, la communauté scientifique n'a pas attendu pour tenter de développer des solutions capables de rationaliser les criblages. Un premier type d'approche vise ainsi à réduire le nombre d'échantillons et de conditions réactionnelles à tester, en réalisant des « plans d'expériences ».<sup>377,391</sup> Ceux-ci sont générés à partir de logiciels qui sont chargés de déterminer les points essentiels pour pouvoir couvrir l'ensemble de l'espace formé par les paramètres à tester, puis d'extrapoler les points non criblés afin de produire les fonctions liant ces paramètres au critère de sélection du catalyseur. L'autre approche est basée sur le remplacement ou la complétion des stratégies de criblage par des études théoriques *in silico* des catalyseurs. Parmi les différents types d'approches utilisées, on pourra par exemple citer la *density functional theory* (DFT), qui fait partie des nombreuses techniques employées en chimie théorique, et qui peut être utilisée pour évaluer les interactions électroniques entre un centre catalytique chimique et une molécule, aidant à déterminer le chemin réactionnel et l'activité de celui-ci pour cette dernière.<sup>392,393</sup> En enzymologie, on pourra également mentionner le *docking* protéine-ligand, qui a lui aussi pour objectif de déterminer les interactions entre les deux, et de prédire l'affinité pour le substrat et le mécanisme catalytique par minimisation du niveau d'énergie du système.<sup>394</sup> Ces approches présentent néanmoins deux principaux défauts. D'une part elles ne prennent que peu en compte les données issues des criblages, celle-ci étant principalement basées sur des calculs théoriques, et d'autre part, elles nécessitent ce faisant une très importante puissance de calcul, laquelle croît avec la complexité du système (nombre d'atomes pris en compte, d'interactions, de paramètres, etc.). Aussi, si elles permettent bien, dans certains cas, d'estimer assez l'activité ou la sélectivité d'un catalyseur, elles ne permettent pas d'en cribler virtuellement une grande quantité, et n'offrent donc pas, elles non plus, une vision globale de la diversité disponible.

En parallèle de ces innovations, plusieurs équipes de recherche ont très tôt tenté de réaliser la prédiction des propriétés des catalyseurs de manière systématique et automatisée. Celles-ci ont d'abord reposé sur l'utilisation d'outils assez conventionnels, tel que l'alignement de séquences pour les enzymes, ou de manière un peu plus évoluée, la reconnaissance de certains patterns structuraux qu'elles partagent de

manière plus ou moins universelle.<sup>395,396</sup> Toujours pour les enzymes, ces descripteurs ont ensuite été rassemblés dans des bases de données, telles que PFAM<sup>397,398</sup> (aujourd'hui devenue InterPro)<sup>399</sup>, lesquelles ont évolué en même temps que les outils de prédiction qu'elles utilisent. Ceux-ci ont ainsi assez rapidement bénéficié de la forte croissance de l'apprentissage machine, ou *machine learning* (ML), une des branches de l'intelligence artificielle, et ce dès le début des années 2000. On peut par exemple citer une revue produite par Arimoto en 2006 qui faisait déjà état de l'utilisation d'algorithmes de type « support vecteur-machine » (SVM) pour la prédiction de l'interactions entre des cytochromes P450 et des potentiels inhibiteurs.<sup>400</sup> Ou même encore les prémisses de la prédiction de catalyseurs chimiques avec des réseaux de neurones à travers la série de travaux de Hattori et Kito à la fin des années 1980-début 1990.<sup>401-404</sup> En effet, on a souvent à l'idée que le domaine scientifique de l'intelligence artificielle est quelque chose de très récent. Or ce concept remonte aux années 1950, et a connu plusieurs phases de développement avec des périodes de forte innovation, et des périodes de presque disparition (1974-1980 et 1987-1993). Nous vivons donc aujourd'hui le 3<sup>ème</sup> « boom », celui de l'apprentissage machine, lequel est estimé avoir débuté vers le milieu des années 1990. Celui-ci profite très largement de la généralisation de la génération et de la collecte des données, et notamment de celles générées par le criblage haut débit et les approches *in silico* dans les domaines de la chimie et de la biologie. A vrai dire l'intelligence artificielle, et en particulier tout le pan de l'apprentissage supervisé (*supervised learning*), se couple particulièrement bien avec les approches robotisées dans la mesure où elle excelle justement à mettre en évidence des corrélations, à priori peu évidentes, entre différents paramètres, tout en requérant une très grande quantité de données consolidée pour le faire. D'autant que suivant la quantité de données effectivement à disposition, différentes approches sont disponibles pour leur exploitation. A titre d'exemple, en catalyse chimique, le nombre d'échantillons par batch étant assez restreint (généralement 24), les criblages ne génèrent que rarement plus de quelques centaines de points. Il est alors préféré l'utilisation d'algorithmes de régression linéaire simples, des méthodes logistiques, ou encore des arbres de décision, à ce que l'on appelle l'apprentissage profond (*deep learning*), basé sur l'utilisation des réseaux de neurones artificiel.<sup>405</sup> En biologie, où le nombre de données générées est revanche beaucoup plus important, notamment grâce à l'utilisation de système en plaques 384, 1536 ou même 6144 puits, ainsi qu'à celle de la microfluidique, l'apprentissage profond est de plus en plus utilisé. Les dernières innovations de ce domaine, telles que les réseaux de type *transformers* qui sont d'ailleurs utilisés pour la conception des *large language models* dont est issu ChatGPT,<sup>406</sup> permettent désormais de véritables prouesses concernant la prédiction des propriétés des protéines. L'exemple qui est sûrement le plus marquant de la dernière décennie est celui d'Alphafold. Développé par la société DeepMind, appartenant aujourd'hui à Google, cet algorithme s'est fait connaître en remportant deux fois de suite le concours CASP (*Critical Assessment of Structure Prediction*), en 2018<sup>407</sup> puis en 2020.<sup>408</sup> Le CASP est une expérience communautaire visant à déterminer et à faire progresser l'état de l'art en matière de modélisation de la structure des protéines à partir de la séquence des acides aminés. Tous les deux ans, les laboratoires du monde entier sont invités à soumettre des modèles pour un ensemble de protéines dont les structures expérimentales ne sont pas encore publiques. Des évaluateurs indépendants comparent ensuite les modèles avec l'expérience, notamment en vérifiant la structure des protéines par cristallographie aux rayons X, et attribuent un score (local-distance difference test (IDDT)),<sup>409</sup> noté sur 100) reflétant la justesse de la prédiction sur l'ensemble de la séquence. Dans sa version 2.0, Alphafold a effectivement obtenu un score supérieur à 90 pour la très grande majorité des protéines prédites, sachant qu'il est considéré que ce seuil est celui auquel les modèles rivalisent avec la détermination structurale par cristallographie. Ceci signifie que l'algorithme est en mesure de prédire la structure de presque n'importe quelle protéine avec une justesse égale à la détermination expérimentale, ce qui a depuis été vérifié par de nombreux euses

chercheur·se·s de la communauté. Pour se rendre compte de l'importance de cette découverte, il convient de rappeler la résolution de ce problème particulier a très longtemps été considéré comme potentiellement insolvable par l'ensemble de la communauté. A titre d'exemple, Benner et Gerloff, deux experts du domaine, affirmaient en 1991 dans leur publication traitant justement de la détermination de structures récurrentes dans la séquence de plusieurs kinases homologues pour la prédiction du domaine catalytique de ces enzymes :<sup>410</sup>

*« Les informations biologiques et biochimiques propres à l'ensemble des protéines considérées sont utilisées pour faciliter la modélisation. La meilleure modélisation structurale est réalisée par des chimistes biologiques qui comprennent la biochimie du système qu'ils étudient et utilisent ce qu'ils savent dans l'effort de modélisation. Néanmoins, plusieurs aspects de l'approche restent controversés. En particulier, l'objectif de nombreux biochimistes est d'obtenir un programme informatique distribuable qui génère automatiquement un modèle secondaire (ou, idéalement, tertiaire) de la protéine, et il est souvent suggéré que c'est le seul objectif acceptable de la recherche dans ce domaine. Nous pensons que cet objectif n'est pas réaliste compte tenu de l'état actuel des connaissances et des hypothèses plausibles sur la manière dont ces connaissances sont susceptibles d'évoluer dans un avenir proche. En outre, nous avons été particulièrement dissuadés de poursuivre cet objectif en sachant qu'il n'a pas encore été atteint pour l'analyse conformationnelle de molécules beaucoup plus petites en solution aqueuse. »*

Comment auraient-ils pu seulement prévoir que tout juste 30 ans plus tard un tel algorithme, exécutable depuis presque n'importe quel ordinateur, permettrait de prédire la structure 3D de la quasi-totalité des enzymes, y compris sous la forme de multimères, utilisées aujourd'hui en synthèse. Cela étant dit, ne leur jetons pas la pierre, cette défiance quant à la possibilité de réaliser ce type de prédiction étant restée largement majoritaire jusqu'à la parution de la première version d'Alphafold lors du CASP13 en 2018, et à juste titre d'ailleurs, les meilleurs algorithmes n'arrivant pas à dépasser les 50 de IDDT. Comme pour les autres outils incorporés précédemment dans les bases de données, une version d'Alphafold est aujourd'hui implémentée dans UniProt par exemple, et la prédiction de toutes les nouvelles séquences protéiques ajoutée est désormais réalisée manière systématique, ce qui ouvre d'énormes opportunités pour la recherche de nouvelles enzymes, comme nous aurons l'occasion d'en reparler un peu plus bas.

Sur le plan technique, pour être en mesure de réaliser sa prédiction, AlphaFold utilise un algorithme basé sur une architecture apparue assez récemment, les *transformers*.<sup>411</sup> Ceux-ci ont été créés pour faire suite aux neurones de type LSTM (*long-short term memory*), faisant eux-mêmes suite aux réseaux de neurones récurrents (*recurrent neural network*, RNN), afin d'en gommer les défauts. La grande différence entre les *transformers* et les RNN/LSTM réside en le fait que les premiers sont en mesure de détecter les corrélations entre chaque « mot » (appelés « *tokens* ») dans une « phrase », de manière indépendante de leur position dans celle-ci, tout en gardant tout de même en mémoire l'information de cette dernière (à l'aide de ce que l'on appelle le *positional encoding*). En d'autres termes, cela signifie que contrairement aux RNN, les *transformers* ne réalisent pas leur apprentissage en lisant les données sous forme chronologique, ou séquentielle (comme la lecture dans l'ordre d'une séquence d'acides-amino), mais utilisent au contraire l'ensemble de la phrase (ou séquence) et évaluent chaque *token* de manière parallèle tout en se souvenant de leur position les uns par rapport aux autres. La corrélation entre les *tokens* est alors réalisée par un mécanisme d'« attention », que nous ne détaillerons pas ici, lequel permet justement de détecter et calculer l'importance statistique des différents types d'interactions existant entre tous les *tokens* de la séquence, y

compris lorsque ceux-ci sont très éloignés au niveau de leur position dans cette dernière. Ceci, ajouté au fait que la parallélisation de leur apprentissage les rend beaucoup plus efficaces (rapides à entraîner et à utiliser), les rend donc bien adaptés à l'étude du langage humain par exemple, ou encore à celle des séquences protéiques, pour lesquelles ils peuvent établir des corrélations de différentes natures, y compris spatiales, entre les acides aminés. AlphaFold, dans sa version 2,<sup>408</sup> utilise ainsi un type de *transformers* créé pour l'occasion, appelé « *evoformers* », qui lui permet de calculer les corrélations entre les aminoacides d'une même séquence en les corrélant à celles présentes entre les aminoacides de différentes séquences proches. Cette seconde partie est censée capturer l'information évolutive entre des protéines similaires afin de faire ressortir la présence d'une co-évolution entre leurs acides aminés. L'algorithme en déduit alors que ceux qui co-évoquent doivent être en contact dans la structure 3D en partant du principe que ceux-ci doivent muter de manière concomitante pour pouvoir maintenir cette dernière. Pour cette déduction, AlphaFold2 utilise en entrée le résultat d'un alignement multiple de séquences (*Multiple Sequence Alignment*, MSA), lesquelles sont sélectionnées par homologie dans les banques de données protéiques. L'alignement peut être réalisé de différentes manières (méthodes progressives, itératives) et repose sur différentes méthodes d'évaluation des similarités présentes entre les sous-séquences d'acides aminés, tel que les matrices de substitution par exemple. Celle-ci (matrices BLOSUM (*BLOCKS SUBstitution Matrix*) et PAM (*Point Accepted Mutation*)), décrivent la possibilité de substituer un aminoacide par un autre sans que cela ne change drastiquement fonctions biologiques de la protéine (repliement, activité, etc.), et reflètent donc l'évolution qu'il peut y avoir de ces dernières. Précisons que les MSA ne sont pas spécifiques aux algorithmes de *machine learning*, et encore moins à AlphaFold. Ils sont en effet utilisés depuis longtemps pour évaluer la conservation des séquences de domaines protéiques, de structures tertiaires et secondaires, voire d'acides aminés ou de nucléotides individuels. Ils sont d'ailleurs utilisables assez facilement par la communauté, étant accessibles pour une partie sous la forme d'outils en ligne comme Clustal Omega. J'ai d'ailleurs utilisé ce dernier durant ma thèse, à la suite des criblages des banques de transaminases, afin de déterminer la proximité des séquences entre-elles et de générer des clusters à partir de celle-ci (Figure 79). Ceci m'a ensuite permis d'appréhender la présence d'une corrélation entre ces clusters et les activités obtenues pour les différents substrats, laquelle s'est révélée assez forte comme nous pouvions nous y attendre, les clusters traduisant assez bien les différentes familles et sous-familles de transaminases présentes dans nos banques grâce aux données évolutives qui les caractérisent.

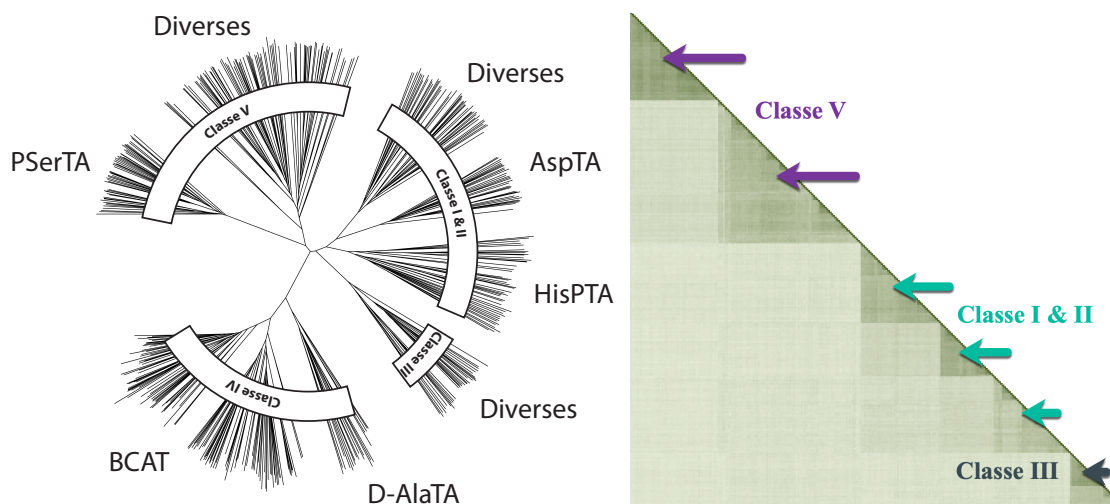


Figure 79 : Dendrogramme (à gauche) obtenu pour la banque de transaminases TAM(A) à partir d'un alignement de séquences multiple (MSA), détaillant les clusters d'enzymes considérés. Niveau d'homologie entre les séquences (à

droite), indiqué par une coloration plus importante, calculé lors de l'alignement des séquences de TAM(A) deux à deux (abscisse et ordonnée) (partie inférieure de l'image tronquée après la Classe III).

(*PSerTA* = phosphosérine transaminase, *AspTA* = aspartate transaminase, *HisPTA* = histidinol-phosphate transaminase, *D-AlaTA* = D-alanine transaminase, *BCAT* = branched-chain aminotransferase)

AlphaFold2 va alors utiliser le résultat du MSA et le transformer en une représentation faisant ressortir les différentes interactions statistiquement les plus importantes entre les résidus des différentes protéines. Celle-ci va être réalisée de manière conjointe avec la conversion de la matrice de contact des acides aminés de la séquence recherchée, également sous la forme d'une représentation mettant cette fois en lumière les interactions entre les aminoacides au sein de la séquence même. L'une des caractéristiques intéressantes de l'AlphaFold2 est que son module d'*evoformers* fait évoluer ces deux représentations de manière interconnectée, l'une influençant l'autre, ce qui permet d'incorporer les notions d'évolution au sein de la séquence recherchée et de sa matrice de contact (Figure 80). Enfin, AlphaFold2 peut également utiliser en entrée de son module d'*evoformers* des patterns protéiques 3D (*templates*), lesquels proviennent des banques telles que la *protein data bank* (PDB), répertoriant la structure des protéines déjà résolues expérimentalement. Cela dit, les auteur·rice·s ont empiriquement observé que l'absence de patterns ne diminuait pas fondamentalement la précision de l'algorithme, les rendant facultatifs.

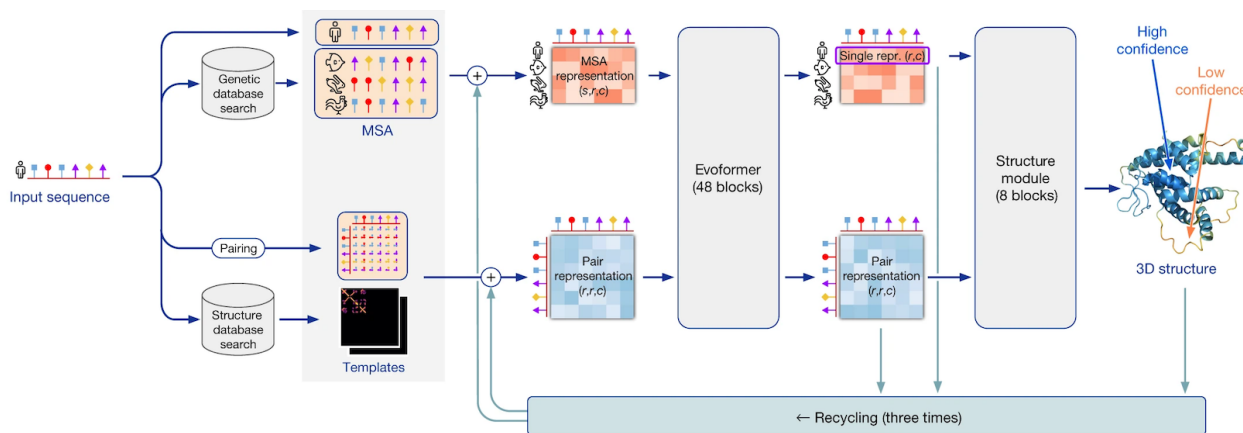


Figure 80 : Schéma de la structure d'AlphaFold2 permettant la prédiction de la structure d'une protéine à partir de sa séquence, en combinant un module composés de blocs d'*evoformers* chargé de produire une représentation des interactions entre les aminoacides d'un alignement de séquences multiple et de la matrice de contact des résidus de la séquence protéique soumise, avec un module chargé de réaliser la prédiction des angles de torsion entre les acides aminés de la chaîne peptidique.

(Image issue de Jumper et coll.)<sup>408</sup>

AlphaFold2 produit donc en sortie de son module d'*evoformers* deux représentations soulignant les interactions au sein des chaînes protéiques, une pour le MSA entre les protéines partageant une certaine identité, et l'autre pour les interactions deux à deux des acides aminés de la séquence recherchée. La première ligne de la représentation du MSA, qui correspond à la séquence de la protéine recherchée est alors utilisée conjointement avec la représentation par paires comme entrée pour un module chargé de déterminer la structure 3D de la protéine recherchée. De manière intéressante, celui-ci calcule de manière itérative la probabilité de chaque angles  $\phi$  et  $\psi$  de la chaîne peptidique, ainsi que les angles  $\chi$ , qui définissent la position de la chaîne latérale des aminoacides. Ces représentations sont initialisées dans un état trivial avec toutes les rotations et positions réglées sur l'identité et l'origine respectivement, la modification desquelles produisant rapidement une structure protéique présentant une position précise des atomes. Les

principales innovations de ce module sont 1) la rupture de la structure de la chaîne peptidique pour permettre un ajustement local fin simultané de toutes les parties qui la composent, 2) l'utilisation d'un *transformer* qui permet à l'algorithme de raisonner implicitement sur les atomes des chaînes latérales non représentés, ainsi qu'un biais, 3) et un terme de perte (variable mathématique) qui donne un poids important à l'exactitude de l'orientation des résidus. De manière intéressante, la détermination exacte de la géométrie des liaisons peptidiques n'est réalisée que dans la relaxation post-prédiction de la structure par descente de gradient dans le champ de force Amber. Empiriquement, cette relaxation finale n'améliore pas la précision du modèle telle que mesurée par le test de distance globale (GDT)<sup>412</sup> ou le score IDDT sur les C $\alpha$  des acides aminés. Elle permet en revanche d'éliminer les violations stéréochimiques gênantes qui peuvent subsister, sans perte de précision au niveau de la structure. Une fois cette dernière prédite, celle-ci est alors utilisée comme entrée pour effectuer jusqu'à 3 itérations successives des deux modules de l'algorithme, lesquelles permettent de raffiner la prédiction finale. Ajoutons pour finir qu'AlphaFold2 a depuis sa parution été amélioré sur de nombreux points, en particulier le MSA qui est probablement l'élément le plus déterminant du modèle, en remplaçant par exemple les systèmes de recherche et d'alignement de séquence JackHMMER<sup>413</sup> et de HHblits,<sup>414</sup> par MMseqs2<sup>415,416</sup> comme dans le cas de ColabFold,<sup>417</sup> rendant l'algorithme beaucoup plus accessible à la communauté. On pourra également citer la possibilité pour AlphaFold2 et ses dérivés de maintenant réaliser la prédiction efficace de multimères,<sup>418</sup> ou même encore du site de liaison d'un large panel de ligands comme des cofacteurs.<sup>419</sup>

Propulsée par ce récent succès, qui ouvre de très nombreuses portes pour la prédiction des propriétés et des protéines, l'intérêt de la communauté scientifique s'est largement investi dans le développement de nouveaux algorithmes de *machine learning*. Notons que cette thématique de recherche n'a pas débuté avec l'arrivée d'AlphaFold, les premières études remontant à une trentaine d'années. On peut tout de même souligner une augmentation exponentielle des publications sur le sujet. Historiquement, les premiers algorithmes visaient principalement, en plus de la prédiction du repliement des protéines,<sup>420-422</sup> l'identification des marqueurs associées à leurs fonctions métaboliques (domaines protéiques, site de liaison du substrat, interactions protéine-inhibiteur, etc.).<sup>396,410,423</sup> Ces recherches avaient d'ailleurs plutôt pour objectif une application dans le domaine médical, et ce n'est que plus récemment que ces outils ont été mis au service de l'utilisation d'enzymes en synthèse. Des algorithmes, de *machine learning* ou non, ont alors vu le jour pour la détermination d'un panel de propriétés des enzymes. On pourra d'abord ainsi retrouver de nombreuses études visant à déterminer le type de réaction que peut catalyser une séquence donnée,<sup>424-430</sup> permettant notamment une fois encore une meilleure compréhension du métabolisme de différents organismes. Les outils que ces études développent sont d'ailleurs aujourd'hui très utiles pour l'ingénierie métabolique et la biologie synthétique, tel que montré par le groupe du Pr. Faulon avec sa suite Galaxy-SynBioCAD.<sup>431</sup> D'autres études se sont intéressées à l'évaluation de la promiscuité et sélectivité des enzymes pour leurs substrats,<sup>430,432-435</sup> ainsi que de l'affinité entre les deux (détermination de la constante de Mickaelis-Menten en particulier).<sup>428,435-438</sup> On peut également mentionner certaines études qui prédisent des paramètres moins souvent étudiés, mais néanmoins importants en biocatalyse, comme la stabilité et la solubilité des enzymes, ou encore leur niveau d'expression.<sup>426,439-443</sup> Ici on pourra mettre en lumière l'outil EnzymeMiner, développé par l'équipe du Pr. Damborsky, qui prend la forme d'une interface web permettant justement d'explorer les banques de données protéiques et d'en récupérer les enzymes qui devraient a priori pouvoir être exprimées correctement, de manière soluble, dans *E. coli*. Cette équipe est d'ailleurs l'un des acteurs majeurs du domaine, en particulier lorsque l'on s'intéresse au couplage entre *machine learning* et criblage à haut débit.<sup>381,444,445</sup> Vient enfin la prédiction de l'activité réelle de l'enzyme correspondant à une séquence donnée, pour un ou plusieurs substrats. C'est le type de prédiction qui

m'intéresse dans le cadre de mes activités de recherche car il est sûrement le premier paramètre à déterminer pour l'utilisation d'une enzyme en synthèse, mais également car il bénéficie particulièrement bien des données expérimentales générées par criblage haut débit. En effet, un nombre important d'études menées jusque-là, y compris pour la prédiction d'activité enzymatiques,<sup>425,446,447</sup> basent l'apprentissage de leur modèle sur des données issues de la littérature, des bases de données ou qui ont été générées de manière théorique, souvent avec l'aide d'algorithmes (tel que les MSA) comme le fait AlphaFold,. La base de données BRENDA<sup>448</sup> a à ce titre été exploitée à de nombreuses reprises comme source pour les constantes cinétiques des enzymes étudiées. Or celles-ci, qu'elles proviennent de BRENDA ou d'autres bases de données, sont généralement obtenues dans des conditions expérimentales souvent très différentes, et généralement non précisées, sans compter les données qui sont tout simplement non reproductibles. Le nombre d'études utilisant effectivement des données expérimentales réalisées spécifiquement pour l'entraînement des algorithmes, dans des conditions contrôlées, reste effectivement très restreint. La grande majorité d'entre elles utilise un modèle pour tenter de prédire les futures mutations à réaliser dans le cadre de l'ingénierie d'enzyme par mutagenèse.<sup>449-452</sup> Elles reposent sur un schéma commun consistant à produire une première banque de variants par des approches bio-informatiques conventionnelles (ou dans certains cas plus rares, par *machine learning* par apprentissage sur des données de la littérature), qui est ensuite criblée afin de générer les données nécessaires à l'entraînement de l'algorithme de prédiction final. Ce dernier prédit alors le nouveau cycle de mutations à effectuer, conduisant à la production d'une deuxième banque, et ainsi de suite. Si de bons résultats ont pu être obtenus avec plusieurs classes d'enzymes, ces approches diffèrent pas vraiment des approches d'ingénierie rationnelle classiques, à l'exception de l'utilisation d'un algorithme pour la production des mutations, et non plus de la compréhension d'un humain des structures, ce qui permet d'accélérer fortement le processus. A noter que malgré l'intérêt croissant pour ce type d'approche, les premières études qui font effectivement état de la comparaison expérimentale directe entre l'évolution dirigée classique et celle réalisée par *machine learning* ne date que des années 2020, le tout premier exemple ayant été rapporté par Voutilainen *et coll.* pour le design de nouvelles désoxyribose-5-phosphate aldolase, afin d'augmenter leur préférence pour des substrats donneurs plus petits et non phosphorylés, et en particulier, l'acétaldéhyde.<sup>435</sup> Ces études ont malgré tout démontré qu'il était ainsi possible de réduire considérablement le nombre de variants à cribler tout en obtenant des résultats au moins équivalents, voir meilleurs. Cependant presque aucune étude ne fait à ce jour mention de l'utilisation du *machine learning* pour la recherche directe de séquences dans les bases de données, voir même pour la génération *de novo* de séquences complètes. On pourra citer l'étude publiée par Ma *et coll.* en 2021 qui joint les deux approches pour l'optimisation d'imine réductases (IRED).<sup>434</sup> Les auteurs ont ainsi commencé par mener une approche d'exploration génomique (*genome mining*) similaire à la nôtre, en partant d'IRED connues, afin de sélectionner un panel de séquences ayant potentiellement une bonne activité vis-à-vis de la 1-(2-amino-6-((cyclopropylmethyl)amino)pyrimidin-4-yl)pyrrolidin-3-one, et produisant l'amine correspondante avec une stéréosélectivité élevée l'amine de configuration *R* (Figure 81).

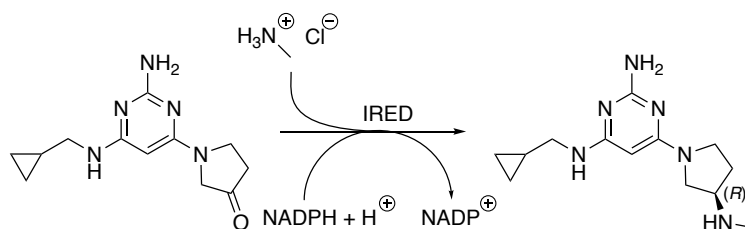


Figure 81 : Réaction visée par Ma *et coll.* lors de leur recherche de nouvelles imine réductases (IREDD) par exploration génomique et ingénierie enzymatique.

Celui-ci a ensuite été criblé, et si des activités supérieures à celles des enzymes de départ ont pu être mesurées, la stéréosélectivité des meilleurs *hits* avait chuté de manière dramatique. La meilleure des enzymes, appelée IRED-88, a ainsi permis d'obtenir un rendement de 70 % avec un excès énantiomérique de seulement 30 %. Un second cycle d'exploration génomique a alors été mené en recherchant des enzymes spécifiquement proches de la séquence de celle ayant montré la meilleure stéréosélectivité lors des essais préliminaire, une IRED de *Mycobacterium mageritense* (acc. num. GenBank : WP\_036431480.1). Celui-ci a cette fois conduit à l'obtention d'une enzyme, la IRED-88-2, capable de réaliser 83 % de conversion dans les conditions testées, tout en maintenant un excès énantiomérique > 99 % pour l'énantiomère souhaité. Les auteurs ont alors tenté d'améliorer à la fois l'activité et la sélectivité de l'IREDD-88, avec une priorité pour le premier paramètre, afin de la rendre compétitive avec l'IREDD-88-2. Une approche conventionnelle (*deep mutational scanning*, DMS) par remplacement systématique de chacun des aminoacides de la séquence de l'IREDD-88 par les 19 autres, une mutation à la fois, a alors été menée en microplaques, soit une banque de 5700 IRED potentielles. Après un criblage réalisé à l'aide d'un spectromètre de masse de type RapidFire (Agilent), il a été possible d'obtenir un résultat pour 82 % de la banque. La majorité des mutations a conduit à une perte de l'activité comme on peut s'y attendre, avec en particulier l'introduction d'une proline au sein de la chaîne. En revanche, il a été mis en évidence de manière très intéressante que les extrémités N- et C-terminales de la structure de la protéine avait des effets positifs sur l'activité de l'enzyme. Concernant la stéréosélectivité, certains mutants ont également permis de l'améliorer, voir dans certain cas de l'inverser. Au final, la mutation S220T a été identifiée comme la plus efficace. Dans les conditions de criblage à haut débit, cette variante a donné une conversion de 70 % et un excès énantiomérique de 96 %, ce qui est proche de l'IREDD-88-2. Une seconde approche par mutagenèse, basée cette fois sur de l'*error prone PCR* (*epPCR*), a également été menée sur l'IREDD-88, avec de 1 à 4 mutations par séquence. La banque correspondante, composée de 2800 mutants, a également été criblée, mais les résultats obtenus se sont révélés largement inférieurs à ceux de la première approche, avec au maximum 54 % de conversion et un excès énantiomérique (*ee*) de 89 %, les deux n'étant pas réalisés par la même enzyme. La même approche a alors été répétée sur le mutant S220T de l'IREDD-88, conduisant cette fois à un hit réalisant 80 % de conversion et 98 % d'*ee* pour l'énantiomère recherché, lequel n'ayant qu'un seul acide aminé de différence avec la séquence de départ. Une troisième et dernière tentative a été menée sur le mutant R148P/S220T/H230Y issu de la précédente. Celui-ci a été sélectionné car il présentait une énantiosélectivité parfaite. Les deux premiers variants résultant de cette dernière tentative ont pu conserver l'excellente sélectivité tout en offrant des conversions légèrement meilleures, avoisinant celle de la IRED-88-2. L'ensemble de ces résultats, représentant le criblage de plus de 10000 mutants, démontre ainsi qu'une approche par mutagenèse ne permet pas forcément de rivaliser avec l'exploration génomique, confirmant le potentiel de cette dernière pour la découverte d'enzymes efficaces comme les auteurs-elles-mêmes remarqué.



Ces dernier·e·s ont alors voulu voir si une approche par *machine learning* pouvait quant à elle rivaliser avec l'évolution dirigée conventionnelle, et en particulier la mutagénèse aléatoire. Pour cela, ils·elles ont utilisé les mesures collectées pour les mutants de l'IRED-88 lors de la DMS et du premier cycle d'*epPCR*, soit environ 5000 points, pour entraîner un modèle de type *random forest* pour la prédiction de la relation structure-activité, en association avec des descripteurs protéiques calculés à partir d'UniRep.<sup>453</sup> Ce dernier est un modèle datant de 2019 (soit avant AlphaFold et l'utilisation des *transformers*) qui est lui-même basé sur une approche d'apprentissage profond utilisant un RNN et ayant été entraîné sur la base de donnée protéique UniRef50 (~ 24 millions de séquences). La représentation unifiée (UniRep) qui en résulte transforme les séquences protéiques en vecteurs de longueur fixe, représentant approximativement les caractéristiques fondamentales des protéines. Deux modèles ont alors été entraînés, un pour les activités, et le second pour la stéréosélectivité. Les variants protéiques proposés *in silico* et sélectionnés pour l'expression étaient les simples, doubles et triples mutants pour lesquels les paramètres prédits étaient les plus élevés. En résultat, le premier modèle a conduit à la prédiction de 200 mutants intéressants, dont 168 ont été produits avec succès. De manière intéressante, l'activité globale de ces nouvelles enzymes a été trouvée comme supérieure à celle des enzymes obtenues par mutagénèse. Pour ce qui est de la stéréosélectivité, les résultats se sont révélés moins bons, même si 27 enzymes ont montré un *ee* > 75 % (81 % au maximum). Les auteur·rice·s ont alors voulu voir si ils·elles pouvaient améliorer la prédiction de leur modèle en incorporant des données structurales. Pour cela la structure de l'IRED-88 a été déterminée par cristallisation entre temps, et utilisée pour classer les résidus comme étant à l'intérieur du site actif, à proximité du site actif ou distal par rapport au site actif. Ma *et coll.* ont ensuite sélectionné les aminoacides ayant mené par mutation à l'obtention des 50 meilleurs *hits* lors des criblages (parmi les 8000 points disponibles à ce moment de l'étude), et ont généré les doubles et triples mutant pour les positions correspondantes, conduisant à une banque de plus de 20000 séquences potentielles. Deux nouveaux modèles ont été entraînés, en rajoutant cette fois une partie des données du deuxième cycle d'*epPCR*, puis ceux-ci ont été utilisés pour sélectionner les séquences les plus prometteuses parmi celles générées juste avant. Au total, 220 mutants, répartis dans chacune des catégories de proximité des mutations vis-à-vis du site actif ont été exprimés. Leur activité globale a une fois encore été évaluée comme supérieure à celle des mutants obtenus lors des criblages, mais cette fois des *ee* > 92 % ont pu être mesurés pour les deux meilleurs *hits*. Les auteur·rice·s en ont conclu quant à l'intérêt de l'utilisation de la structure 3D de l'enzyme pour « guider » la prédiction, même si dans le cas de cette étude, celle-ci n'a pas directement été incorporée au modèle. Pour finir, une dernière approche de prédiction a été menée dans des conditions permettant de mimer des conditions « réelles » d'ingénierie enzymatique pour lesquelles il ne serait pas possible de tester un grand nombre d'enzymes pour entraîner l'algorithme, à cause d'un cout élevé ou d'une complexité importante du test à mettre en œuvre à haut débit. Pour cela un sous-ensemble jeu de données du criblage par DMS a été constitué en sélectionnant au hasard 27 des simples mutants générés pour celui-ci. Un algorithme, uniquement pour les activités cette fois, a ensuite été à nouveau entraîné sur ce sous-ensemble, ainsi que sur UniRep, et a enfin été utilisé pour sélectionner les meilleurs doubles et triples mutants correspondant à ces 27 positions. De manière surprenante, la distribution de l'activité a de nouveau été mesurée comme plus élevée par rapport aux cycles d'évolution dirigée traditionnelle, mais pas de manière aussi significative que pour les deux approches de *machine learning* précédentes. Les gains en énantiosélectivité sont quant à eux restés modérés ce qui est normal dans la mesure où ce critère n'a pas été pris en compte pour l'apprentissage de ce dernier modèle. Pour terminer leur étude, Ma *et coll.* ont également produit les meilleurs mutants issus des différentes approches, par mutagénèse et par *machine learning*, et ont globalement pu retrouver les résultats observés dans les criblages. Cette étude démontre

ainsi parfaitement comment ce dernier, combiné à des résultats expérimentaux fiables, peut permettre de grandement réduire le nombre de candidats à cribler, mais plus encore, de proposer des séquences plus efficaces, faisant intervenir des interactions entre les acides aminés qu'il serait difficile de déceler par une approche bio-informatique conventionnelle. On pourrait également imaginer utiliser ce type de combinaison, non pas pour prédire la génération de mutants, mais à la place pour compléter une approche d'exploration génomique, prédisant les séquences les plus intéressantes à aligner dans les bases de données. C'est précisément ce que je compte développer dans le cadre de mon projet de recherche, avec comme objectif premier de pouvoir trouver de nouvelles enzymes utilisables dans le cadre de procédés hybrides, notamment en criblant pour une activité mais également une thermostabilité élevée pour une meilleure compatibilité avec les catalyseurs chimiques. A plus long terme, je m'intéresserai aussi à prédire la capacité d'immobilisation d'une séquence donnée sur un MOF, ce paramètre étant au moins aussi important pour la création des MMCH, tel que j'aurai l'occasion de le détailler dans la suite de ce manuscrit.

### ***Prédiction de l'activité de transaminases à l'aide d'un modèle de machine learning entraîné sur des données de criblages à haut débit et des complexes 3D enzyme-substrat obtenus par docking automatique***

Afin de pouvoir me former aux techniques nécessaires à la conception d'algorithmes de prédiction de *machine learning*, notamment à travers le développement de premiers outils qui nous seront utiles pour la prédiction des différentes propriétés listées précédemment, j'ai commencé par tenter d'exploiter le jeu de données généré lors des criblages des banques TAM, pendant et après ma thèse. Comme j'ai pu le préciser précédemment, la forte corrélation que nous avons pu observer entre les activités des enzymes pour les différentes familles de substrats et les groupes de séquences obtenus par alignement, nous laisse en effet supposer qu'il est possible de développer une méthode de prédiction reliant ces dernières avec la capacité catalytique des enzymes correspondantes. A noter qu'une étude parue en avril 2023 est venue renforcer cette hypothèse, celle-ci ayant, comme décrit dans la partie précédente, associé de l'ingénierie protéique par mutagenèse à la prédiction par *machine learning*, pour l'optimisation de transaminases.<sup>449</sup> Dans cette étude, Ao *et coll.* ont d'abord créé des mutants de l'amine transaminase de *Ruegeria sp.* (PDB acc. num. 3FCR) par design rationnel. Après criblage, les meilleurs *hits* ont fait preuve d'une activité catalytique améliorée (jusqu'à 2000 fois) ainsi que d'une stéréosélectivité inversée pour certaines. Mais plus encore, ces résultats ont permis à Ao *et coll.* de générer un jeu de données de haute qualité, dans des conditions identiques et calibrées. Celles-ci ont par la suite été associées à un nouveau système d'encodage des propriétés (hydrophobes, hydrophiles, basiques, acides, et encombrement stérique) des aminoacides de l'enzyme et des substrats, et utilisées pour l'entraînement d'un modèle de prédiction d'activité et de stéréosélectivité basé sur un arbre de régression de type *gradient boosting*. À l'aide de celui-ci, il a alors été possible de générer de nouveaux mutants, dont l'activité s'est montrée jusqu'à 3 fois supérieure au meilleur hit du criblage. Bien que mes travaux dans le domaine aient débuté en 2021, cette étude conforte la possibilité de mettre au point un système de prédiction similaire, basé cette fois sur de l'apprentissage profond, en m'appuyant sur notre large jeu de données vérifiées expérimentalement. A noter que comme le témoignent les auteurs, *les modèles de prédiction de l'activité pour les transaminases restent difficiles à mettre au point en raison de la difficulté à obtenir des données d'entraînement de haute qualité*, justifiant d'autant plus notre approche.

En revanche, dans notre cas, l'objectif final n'est pas la génération de mutants, mais plutôt comme je l'ai évoqué, de pouvoir utiliser notre futur algorithme de prédiction pour le criblage *in silico* de l'ensemble des séquences de UniProt, afin de réaliser une exploration génomique qui soit plus efficace, moins basée sur l'aléatoire (notamment en s'affranchissant de la sélection des représentants lors du clustering), et qui

conduisent à un criblage d'un nombre de protéines restreint (Figure 82). Pour cela notre algorithme devra être en mesure d'établir, comme dans le cas de l'étude d'Ao *et coll.*, les relations existantes entre les enzymes, les substrats et l'activité des premières pour les seconds.

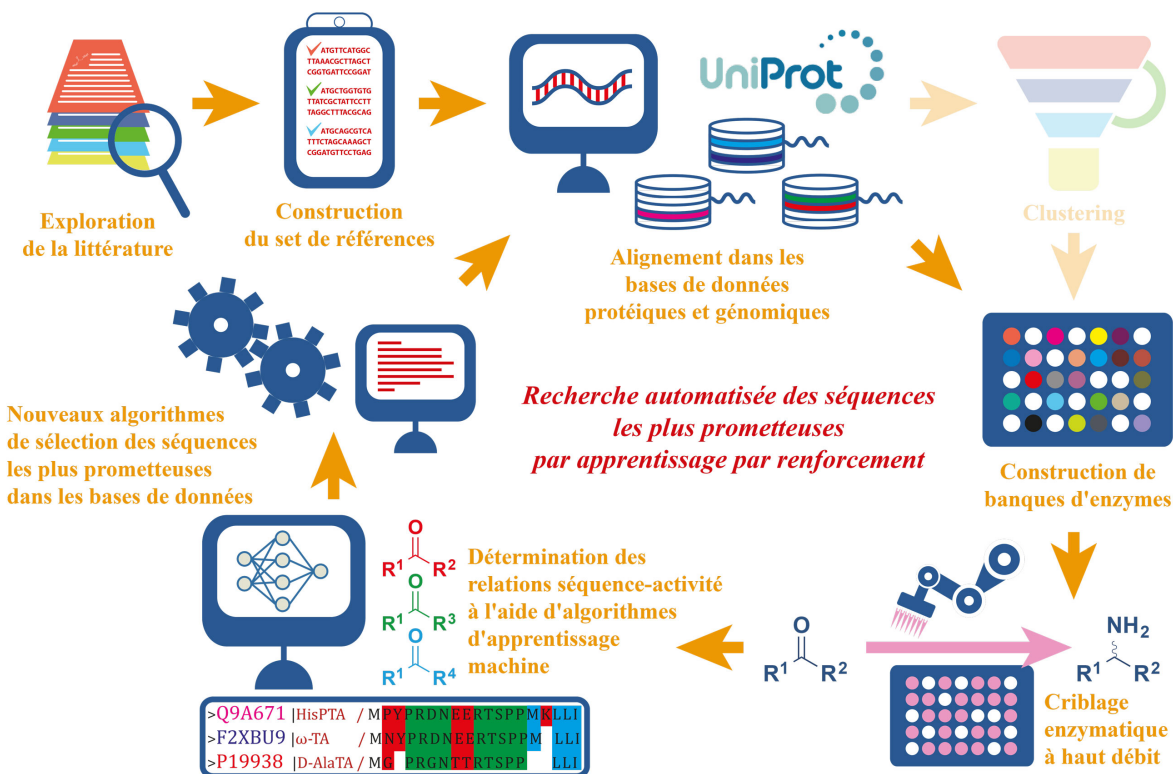


Figure 82 : Concept pour l'exploration génomique basé sur le développement d'algorithmes de *machine learning*, entraînés sur des données de criblage à haut débit, conduisant à l'élaboration d'un système d'apprentissage par renforcement.

Quelques premiers essais préliminaires ont d'abord été réalisés sur notre jeu de données il y a quelques années, à travers des collaborations avec le Pr. Jean-Loup Faulon (Institut Micalis) et les Dr. Mark Dörr (Université de Greifswald, Allemagne) et Dr. Stefan Born (Université Techniques de Berlin, Allemagne). Plusieurs corrélations intéressantes ont pu être mise en évidence sur les résultats de la banque TAM(A) (sur les  $\alpha$ -transaminases), en particulier avec le glutamate comme donneur, ce qui nous a poussé à déposer deux années de suite deux demandes de financement à l'ANR sous le programme PRCI (*projets de recherche collaboratifs internationaux*) mais qui n'ont malheureusement pas été financées. Aussi j'ai plus récemment repris ces travaux dans le cadre du projet de la chaire ANR-Solvay-Centrale Lille PLASTILOOP2.0 afin de voir si nous pouvions aller plus loin et consolider ces résultats. PLASTILOOP2.0 n'a pas pour objectif principal de réaliser la prédiction de l'activité de transaminases, mais dans la mesure où ce projet nécessitera la programmation de nouveaux algorithmes de *machine learning*, notamment pour pouvoir tenter de prédire la capacité de dégradation de nos souches microbiennes vis-à-vis des différents polymères étudiés, nous avons voulu voir si nous ne pouvions pas d'abord nous entraîner sur le jeu de données précédent, en attendant les résultats des criblages obtenus dans le projet. En particulier, avec mon collègue, le Dr. Tao Jiang (E2P2L, Chine), que j'ai rencontré dans le cadre de ce projet, nous avons commencé par tenter de réaliser une prédiction basée uniquement sur les séquences des enzymes, les structures des substrats et les

activités. La première question à laquelle il nous a fallu répondre a concerné le type de réseau de neurones à utiliser pour capturer les propriétés des deux premières, sachant que nous avons choisi dans un premier temps de tenter d'encoder à la fois le donneur et l'accepteur. La séquence peptidique étant disponible sous la forme d'une chaîne de caractères, nous nous sommes demandé s'il était possible d'utiliser, tel que cela avait été précédemment fait, des neurones de type LSTM. Pour les substrats, nous avons choisi de linéariser leur structure de manière à également pouvoir obtenir une chaîne de caractères, sur laquelle il serait possible d'utiliser les LSTM, mais également un type d'architecture plus simple basé des couches de neurones convolutionnels (*convolutional neural network, CNN*) à une dimension (1D). Pour cela nous avons choisi d'utiliser la représentation SMILES (*simplified molecular-input line-entry system*) qui permet justement de réaliser cette opération sans perdre trop d'informations structurales (Figure 83).

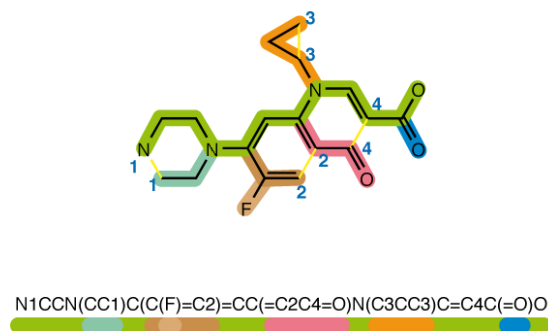


Figure 83 : Exemple de représentation SMILES de la ciprofloxacin, permettant de convertir la structure de la molécule en une chaîne de caractère conservant l'agencement des atomes et le type de liaisons entre eux. (Image issue de la [page Wikipedia anglophone pour le format SMILES](#))

Nous avons ensuite proposé une première architecture composée de 3 modules, chacun chargé d'encoder les deux substrats et la chaîne peptidique respectivement (Figure 84). Leur sortie est alors concaténée sous la forme d'un vecteur unique, lequel est passé dans un réseau dense de neurones entièrement interconnectés. Compte-tenu du fait que cette étude s'inscrit dans le projet confidentiel PLASTILOOP2.0, et que ces travaux n'ont pas encore été publiés, je ne suis pas en mesure de donner les détails de cette architecture dans ce manuscrit (nombre de couches, fonctions d'activation et de perte, etc.).

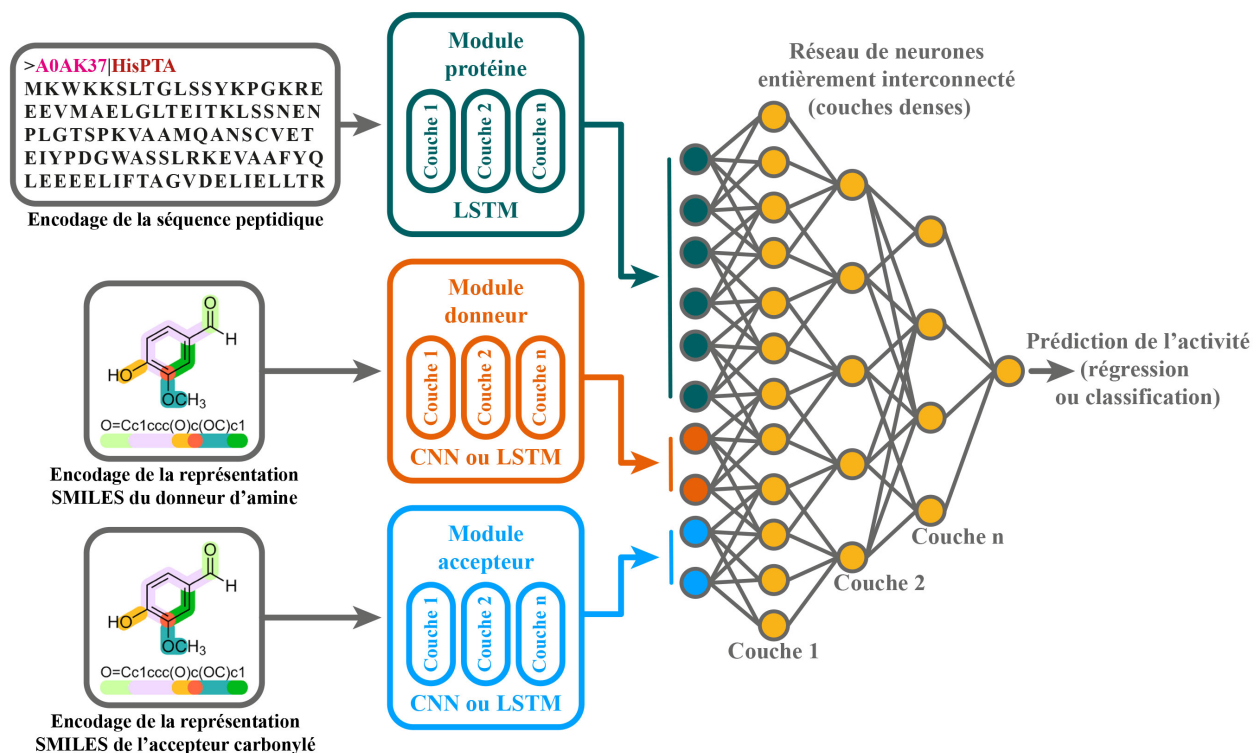


Figure 84 : Première architecture développée pour la prédiction de l'activité (régression ou classification) des transaminases de TAM(A), reposant sur un premier jeu de 3 modules, pour l'encodage de la protéine, du donneur, et de l'accepteur, basés sur des CNN 1D ou des LSTM, couplé avec un réseau dense interconnecté.

Dans les deux cas nous avons choisi de réaliser la prédiction soit sous la forme d'une régression sur la valeur d'activité, étant l'objectif principal à atteindre, soit sous la forme d'une classification, afin de simplifier la tâche pour le modèle, en subdivisant les données en 2 et 4 classes de valeur d'activité ( $< 0,01$  ;  $> 0,01$ ) et  $(0-0,01$  ;  $0,01-0,1$  ;  $0,1-1$  ;  $> 1$ ). Le nombre de valeurs d'activités proche de zéro étant particulièrement élevé, nous avons également réalisé plusieurs tentatives en supprimant ou non les substrats qui n'ont donné aucun hit au niveau de TAM(A), les enzymes qui n'ont pas été correctement exprimées, ou encore les données ne passant pas les seuils statistiques déterminés lors de l'analyse des résultats des criblages. Enfin, le jeu de données a été subdivisé pour générer un sous-jeu d'apprentissage (*training set*) et de validation (*validation set*) et de test (*testing set*) afin de réaliser une validation croisée de type k-fold à l'aide de l'outil inclus dans la bibliothèque [scikit-learn](https://scikit-learn.org/). Les modèles ont alors été entraînés en faisant varier plusieurs hyperparamètres, dont le nombre de nœuds des modules CNN et LSTM, ainsi que du réseau dense, et le nombre de subdivision des données en sous-jeu de d'apprentissage et de test. A ce jour les meilleurs résultats obtenus avec cette première architecture proviennent de la combinaison de CNN-1D pour l'encodage des substrats et du module LSTM pour les séquences peptidiques. En classification nous avons réussi à obtenir une précision jusqu'à 0,95 de  $r^2$  pour le *training set* et 0,91 pour le *testing set* lorsque les données étaient subdivisées en 2 classes. Lorsque celle-ci étaient subdivisées en 4 classes, la précision est tombée à 0,93 et 0,89 respectivement pour le *training* et *testing set* (Figure 85). A noter que ces résultats ont été obtenus de manière identique avec les deux types d'architectures utilisant des LSTM ou des CNN-1D pour l'encodage des substrats.

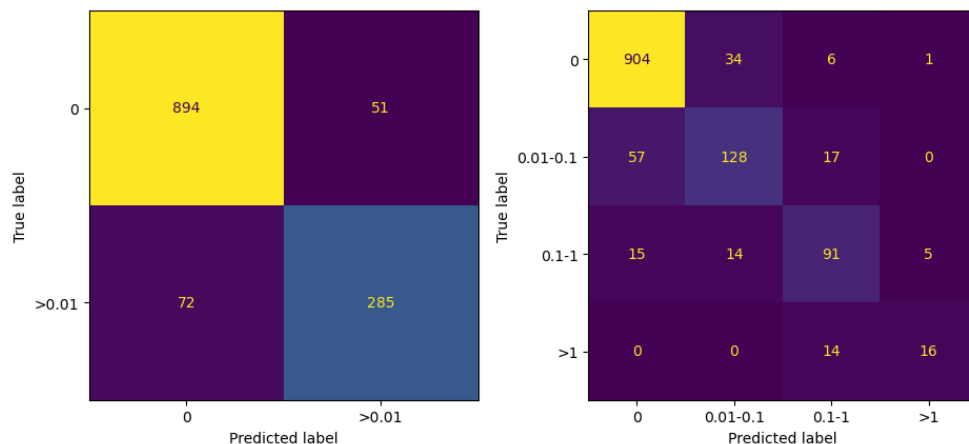


Figure 85 : Matrices de corrélation obtenues pour la répartition prédictive en 2 (à gauche) ou 4 (à droite) classes du *testing set*, avec une architecture combinant des modules CNN-1D pour l'encodage des substrats avec un module LSTM pour celui des séquences protéiques, couplés à un réseau dense.

En régression maintenant, nous avons obtenu au mieux une valeur d'erreur (RMSE, *root-mean-square error*) de 0,019 les modules de CNN-1D. Lors de l'utilisation de modules LSTM pour les substrats, une erreur plus importante a été mesurée sur le *testing set*, avec une valeur RMSE = 0,026 (Figure 86).

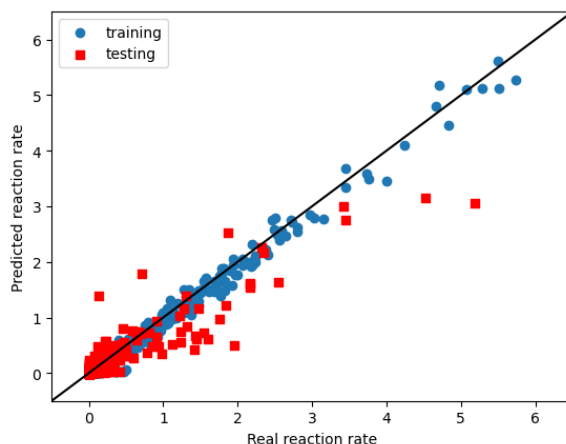


Figure 86 : Graphique représentant la différence entre les valeurs prédites et les valeurs réelles d'activité, obtenue avec une architecture combinant des modules CNN-1D pour l'encodage des substrats avec un module LSTM pour celui des séquences protéiques, couplés à un réseau dense.

Même si nous ne sommes pas encore en mesure d'efficacement prédire précisément l'activité des séquences de notre banque pour un substrat donné, et encore moins pour un substrat inconnu, ces premiers résultats sont tout à fait encourageants. Ils sont en effet équivalents à ce qui a été décrit dans la littérature avec d'autres approches sur d'autres familles d'enzymes. A titre d'exemple, pour leur meilleur modèle, Ao *et coll.* ont obtenu en régression un  $r^2$  de 0,905, et une valeur RMSE = 0,686. Cependant, même si ces valeurs sont moins bonnes que les nôtres, la mauvaise distribution de nos activités, avec une part très importante de celles-ci proches de zéro, fausse quelque peu l'interprétation. On remarque à ce titre sur le graphique ci-dessus que les hautes valeurs d'activités ont fortement tendance à être sous-estimées. Ceci peut être intéressant pour la recherche d'enzymes puisqu'en sélectionnant les enzymes ayant l'activité prédite la plus élevée, il est possible que celle-ci soit en réalité encore plus importante. Mais il conviendrait

tout de même de tester plus d'enzymes ayant des activités élevées ( $> 0,01$ ) afin de mieux équilibrer notre jeu de données pour améliorer la prédiction sur l'ensemble de l'échelle de valeurs. Suite à ces premiers résultats, nous sommes en train de tester de nouveaux types d'architecture afin d'augmenter la précision de la prédiction, notamment en envisageant l'utilisation de *transformers* comme dans le cas d'AlphaFold, et en utilisant les données des alignements réalisés sur les séquences.

Une voie complémentaire que nous avons commencé à explorer repose sur l'ajout d'un module supplémentaire à notre architecture, lequel sera chargé d'encoder cette fois des données structurale, en utilisant un réseau de type graph (*graph neural network*, GNN). Bien qu'encore assez peu répandus dans le domaine, les GNN, et plus particulièrement des GCN (*graph convolutionnal network*), ont en effet récemment été utilisés avec succès pour tenter de prédire l'activité de séquences protéiques,<sup>425,446</sup> en capturant notamment les information tri-dimensionnelles des protéines, et des interactions qui peuvent en découler lors de leur association avec des ligands (autres protéines ou molécules chimiques). L'utilisation de ce type de données est désormais fortement facilitée par AlphaFold2, lequel permet de prédire la structure 3D de n'importe quelle enzyme, y compris pour des larges jeux de séquences. Il est alors possible d'envisager de réaliser le *docking* des substrats testés lors des criblages avec ces dernières, afin de générer un complexe enzyme-substrat 3D, les données duquel pouvant permettre au modèle final de corrélérer les acides aminés les plus importants pour l'interaction avec le ligand et la séquence protéique (Figure 87).

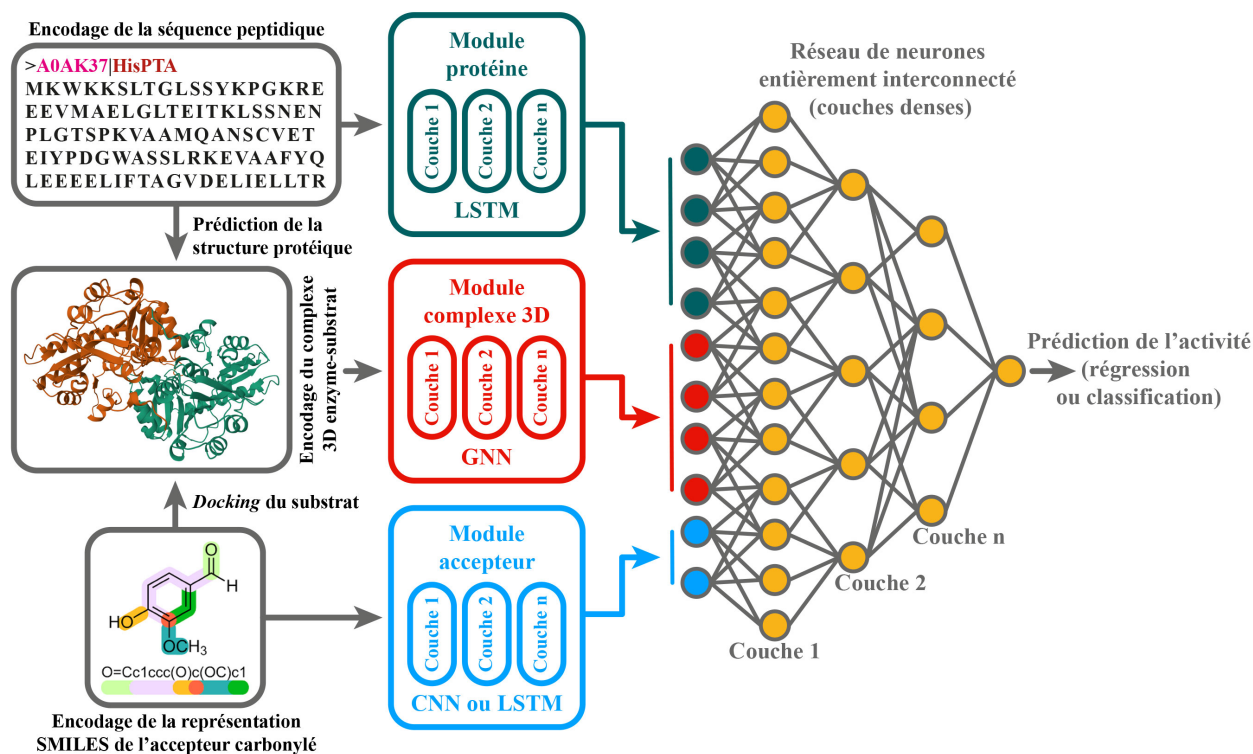


Figure 87 : Seconde architecture développée pour la prédiction de l'activité (régression ou classification) des transaminases de TAM(A), reposant sur un premier jeu de 3 modules, pour l'encodage de la protéine, de l'accepteur et de la structure 3D du complexe enzyme-substrat, basés sur des CNN 1D, LSTM et GNN, couplé avec un réseau dense interconnecté.

Aussi dans le cadre de courts stages réalisés par Badr-Eddine Marani, Emilien Millet, et surtout Guillaume Darlot, nous avons cherché à mettre au point un *workflow* entièrement automatisé permettant de construire le complexe 3D enzyme-substrat et d'en générer une représentation sous la forme d'un graph

pour l'apprentissage d'un GNN. Pour cela nous avons choisi d'utiliser des outils déjà existant pour la prédiction de la structure 3D de la protéine, et du *docking*, puis de créer notre propre algorithme pour la conversion de la structure en graph et l'apprentissage du GNN. La première étape de notre pipeline a donc consisté à prédire l'ensemble des structures 3D des transaminases de la banque TAM(A). Pour cela, Badr-Eddine a implémenté sur un serveur local l'outil ColabFold<sup>417</sup> que j'ai eu l'occasion de précédemment mentionner et qui utilise MMSeqs2 pour la réalisation du MSA. Celui-ci nous a permis d'obtenir toutes les structures avec un pLDDT supérieur à 90 pour la majeure partie de la séquence, à l'exception des séquences N-terminales des deux sous-unités qui ne sont pas assez contraintes. Nous avons ensuite choisi d'utiliser l'outil P2Rank<sup>454</sup> pour la détermination automatique du site actif dans les structures. Cet algorithme se base sur des arbres de décision, sans l'utilisation de *template*, pour prédire les poches d'aminoacides ayant la probabilité la plus forte d'accueillir un ligand (appelé score de « *ligandability* »). Après application de celui-ci sur les structures précédemment générées, nous avons pu prédire le site actif le plus probable pour toutes les enzymes de la banque. Outre le score, nous avons également vérifié au hasard plusieurs enzymes pour voir si nous retrouvions bien une lysine au fond de la poche. Nous avons également comparé les sites actifs prédit avec ceux vérifiés expérimentalement pour les enzymes de la banque qui étaient déjà cristallisées, ou dont la séquence est très proche de transaminases déjà élucidées, et avons trouvé une très bonne corrélation (Figure 88).

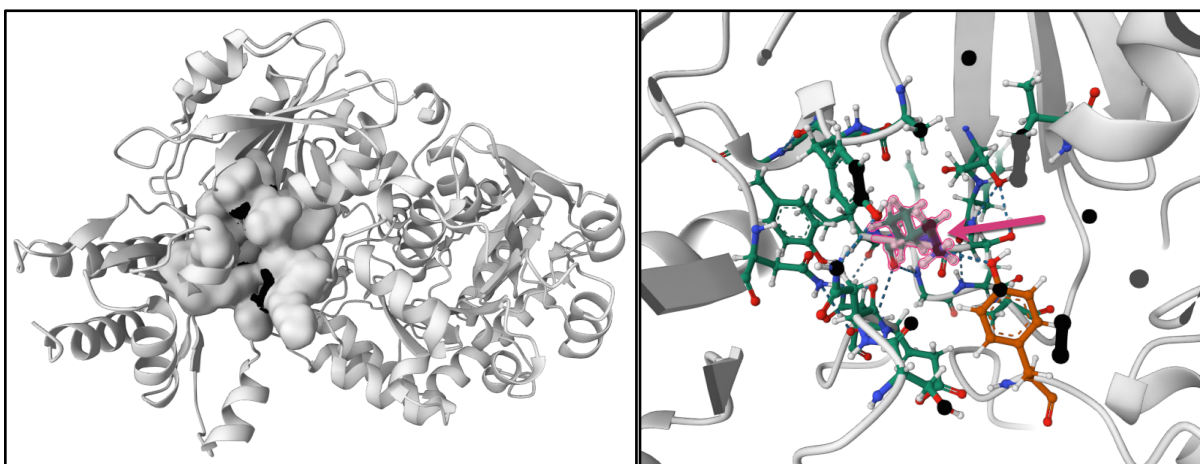


Figure 88 : Poche protéique ayant obtenu le plus haut score de fixation d'un ligand à l'aide de l'outil P2Rank pour la transaminase A0AK37 (acc. num. UniProt) de la banque TAM(A). L'image de gauche montre la structure globale au format cartoon, avec la poche prédite représentée en surface gaussienne. L'image de droite montre l'intérieur du site actif prédit, et la flèche rose pointe vers la lysine présente à l'intérieur de la poche.

Ayant identifié la poche sur laquelle effectuer la *docking* des substrats, nous avons ensuite sélectionné le très récent programme GNINA,<sup>455</sup> qui utilise un modèle basé sur une architecture CNN, pour réaliser l'assemblage du complexe. Compte-tenu du nombre restreint de substrats donneurs utilisés lors des criblages, nous avons choisi de nous concentrer sur les accepteurs uniquement. Nous avons préalablement commencé par réaliser la *docking* du cofacteur sur l'enzyme afin de contraindre la position de l'accepteur dans la poche et de se rapprocher au maximum des conditions réelles d'un cycle catalytique. Compte-tenu du mécanisme réactionnel des transaminases, nous avons par conséquent *docké* la pyridoxamine (PMP) à la place du PLP dans la mesure où c'est elle qui va former une aldimine externe avec l'accepteur. Notons que l'avantage du *docking* de la PMP est qu'elle n'est pas liée de manière covalente à l'enzyme ce qui simplifie largement l'opération. Pour cela, nous avons sélectionné les 4 acides aminés qui obtenaient le



meilleur score avec P2Rank pour la poche considérée et avons réalisé un *docking* flexible de la PMP avec GNINA. L'introduction de la flexibilité dans la chaîne de ces résidus a en effet permis d'obtenir de bien meilleurs résultats lors des essais préliminaires, réalisés sur des structures 3D de transaminases issues de la PDB pour lesquelles nous avons au préalable supprimé le PLP (Figure 89).

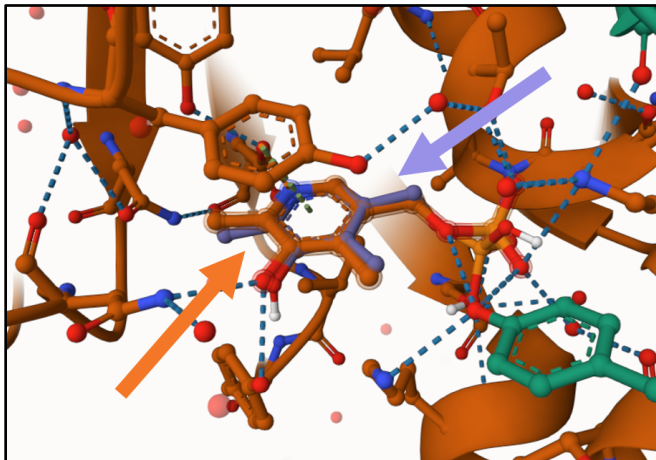


Figure 89 : Comparaison entre l'emplacement prédit pour le PLP (violet) et la localisation réelle du PLP (orange) dans le site actif d'une transaminase dont la structure 3D était présente dans la PDB.

Nous avons ensuite combiné l'association de la PMP et de la structure de l'enzyme sous la forme d'un nouveau fichier PDB et avons procédé au *docking* de l'accepteur cette fois, en utilisant la même approche. Comme il est possible de le voir dans l'exemple ci-dessous, basé sur la structure de la Q5N2G0 (acc. num. UniProt) et l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique (KG), le *docking* a permis d'obtenir des structures crédibles (Figure 90).

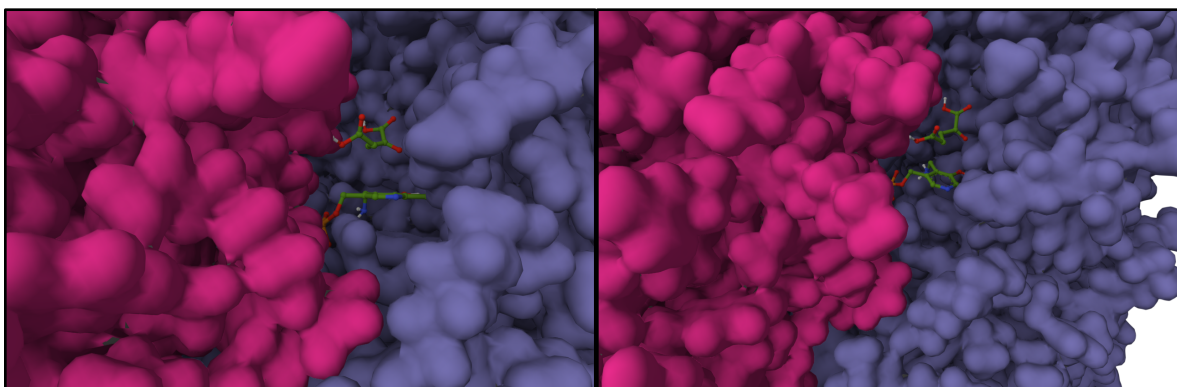


Figure 90 : Visualisation, avec deux angles différents (images droite et gauche) de la structure résultant du *docking* successif de la PMP et de l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique dans la transaminase Q5N2G0 (acc. num. UniProt).

Cependant, on peut remarquer que dans cet exemple, l'amine de la pyridoxamine n'est pas tournée vers la cétone de l'accepteur, ce qui ne correspond probablement pas au véritable agencement des deux. Ceci peut malgré tout être sûrement expliqué par les étapes de *docking* menées de manière successive, la PMP n'ayant pas été *dockée* en présence du substrat, et son amine n'ayant par conséquent pas lors de celui-ci le groupement avec lequel elle est censée interagir. Afin de vérifier cette hypothèse il serait possible de supprimer la PMP et de la *docker* à nouveau dans la structure formée par la protéine et l'accepteur, pour voir si sa localisation, et en particulier celle de son amine libre, vient à changer. Nous avons d'ailleurs prévu

de mettre en place un système de *docking* cyclique, lors duquel la PMP et l'accepteur sont tour à tour supprimés puis *redocké* dans l'enzyme, en présence de l'autre ligand, afin de voir si cela peut augmenter la précision.

Un autre phénomène intéressant que nous avons pu constater est le changement d'orientation des chaînes latérales des acides aminés que nous avons choisi de garder flexible, montrant comment la structure de l'enzyme s'est en effet adaptée à l'accommodation des ligands (Figure 91). Je précise que le nombre d'acides aminés gardés flexibles a été choisi de manière arbitraire afin de limiter le coût en calcul. Il serait évidemment intéressant d'également optimiser ce dernier, voire de le faire de manière automatique et récursive en examinant à chaque fois le score donné par GNINA, même si ce type d'optimisation devrait s'avérer très coûteux en termes de puissance de calcul, l'introduction d'un nouveau résidu flexible augmentant considérablement la complexité du système et le temps de calcul.

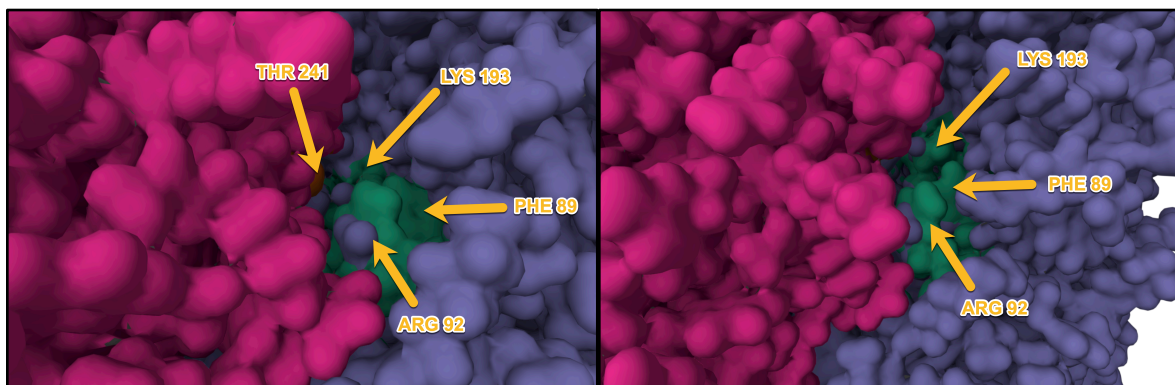


Figure 91 : Comparaisons entre les résidus de l'enzyme après *docking* des deux ligands (rose et violet, pour les deux sous-unités) et avant *docking* (orange et vert, pour les deux sous-unités), en ayant gardé flexibles les chaînes latérales de la THR 241 de la première sous-unité, et la LYS 193 (catalytique), la PHE 89 et l'ARG 92 de la seconde sous-unité.

Afin de nous rapprocher encore un peu plus d'une situation la plus plausible possible pour le mécanisme de l'enzyme, nous avons à nouveau procédé au *docking* mais cette fois en introduisant non plus les deux ligands séparés mais directement la cétimine qui résulte de leur association lors de la transamination (Figure 92). Cet intermédiaire reflète en effet possiblement le mieux la capacité de l'enzyme à effectivement réaliser la réaction, et non pas d'être seulement capable d'accommoder la PMP et un réactif, lequel pourrait d'ailleurs être un inhibiteur.

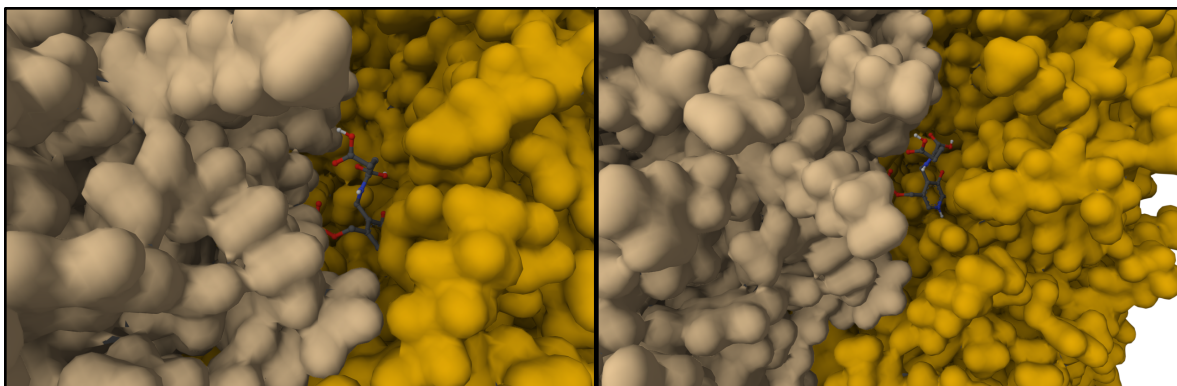


Figure 92 : Visualisation, avec deux angles différents (images droite et gauche) de la structure résultant du *docking* de l'intermédiaire cétime formé par la condensation de la PMP et de l'acide  $\alpha$ -cétooglutarique, dans la transaminase Q5N2G0 (acc. num. UniProt).

Là encore nous avons pu observer, comme nous nous y attendions, à un basculement, parfois même encore plus prononcé, des chaînes latérales des aminoacides laissés flexibles, vis-à-vis à la fois de la structure non *dockée*, mais également de celle *dockée* avec les deux ligands séparés (Figure 93). Dans l'exemple ci-dessous, on peut en particulier observer la chaîne latérale de l'arginine 92 impliquée dans le site actif se retourner complètement et pointer vers l'extérieur du site actif. Il est cependant assez difficile pour le moment pour nous de valider si ces changements d'orientation sont corrects, autrement qu'en évaluant le score global du *docking*. Il s'agit d'un des points qu'il sera important de pouvoir quantifier à l'avenir, d'autant qu'il n'est pas facile de comparer nos résultats avec des résultats expérimentaux, les structures présentes dans la PDB n'ayant à ma connaissance jamais été réalisées en présence de l'intermédiaire cétime.

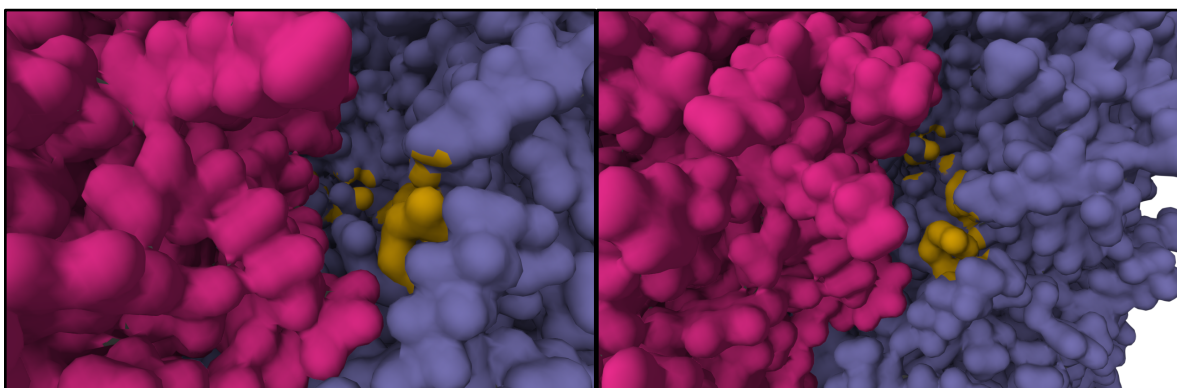


Figure 93 : Comparaisons entre les résidus de l'enzyme après *docking* des deux ligands séparés (rose et violet, pour les deux sous-unités) et après *docking* de la cétime (jaune), en ayant gardé flexibles les chaînes latérales de la THR 241 de la première sous-unité, et la LYS 193 (catalytique), la PHE 89 et l'ARG 92 de la seconde sous-unité.

Si l'on compare enfin l'orientation des ligands entre les *docking*, on s'aperçoit d'un changement d'orientation important de l'intermédiaire cétime par rapport au *docking* séparé (Figure 94). Sans que l'on puisse pour le moment également vérifier la validité de l'un ou de l'autre, cela montre la différence qu'il peut y avoir entre les deux approches, et potentiellement leur complémentarité pour l'entraînement du futur modèle. Nous les intégrerons donc tous deux lors de nos tests d'apprentissage pour voir si l'un donne un meilleur résultat que l'autre.

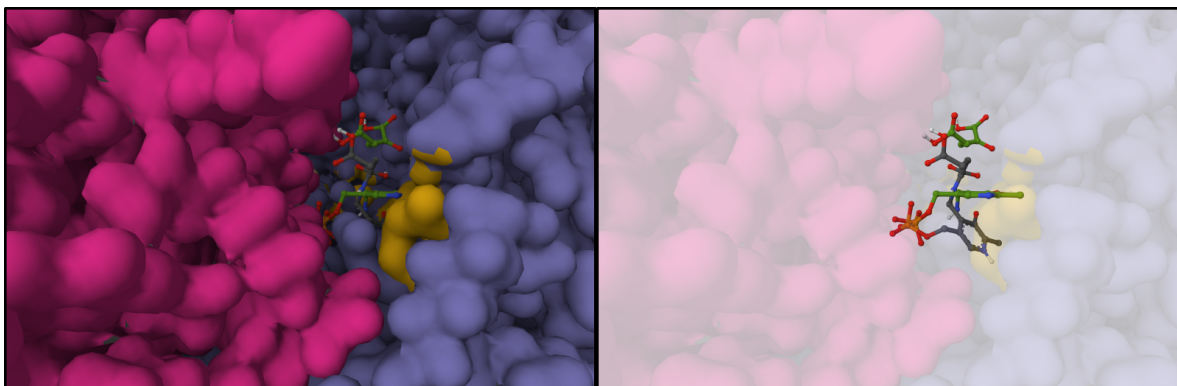


Figure 94 : Comparaison de l'orientation de la PMP et du KG (verts) par rapport à celle de l'intermédiaire cétimine (gris) obtenues lors des deux *docking* réalisés sur la transaminase Q5N2G0 (acc. num. UniProt).

Ayant pu générer les complexes 3D enzyme-substrat de manière assez efficace, nous avons commencé l'intégration de ce *workflow* dans un jupyter notebook afin de le rendre utilisable de manière simple par la communauté mais également de pouvoir l'étendre de manière automatique à toutes les enzymes de TAM(A), les essais n'ayant pour le moment été menés que sur un panel restreint d'enzymes tirées au hasard dans les différents clusters définis par le MSA. En parallèle, nous avons également débuté le développement du modèle afin de construire les graphs qui seront utilisés pour son apprentissage, nous nous sommes demandé quelle serait l'approche la plus pertinente, notamment car il est impossible d'imaginer entraîner ce dernier sur le graph généré par l'ensemble de la structure protéine-substrat, le nombre d'atomes (*nodes*) et d'interactions (*edges*) à prendre en compte étant bien trop grand pour la réalisation de calcul dans un temps et avec une puissance raisonnables. Il faut en effet réduire ce nombre si l'on veut pouvoir entraîner notre modèle sur l'ensemble des complexes enzyme-accepteurs présents dans TAM(A). A noter que ceci semble également pertinent du point de vue biochimique si l'on considère le fait que la première sphère de coordination d'acides aminés de la protéine est majoritairement responsable des interactions avec les ligands et de l'activité de cette dernière. Nous avons ainsi choisi de tester deux options. La première consiste en la simple sélection des atomes par un seuil de distance entre ceux-ci et les ligands. Ceci a pour avantage d'être très simple mais crée artificiellement des relations, potentiellement inexistantes, entre des atomes au niveau du graph résultant. La seconde approche repose sur la sélection des atomes ayant effectivement des interactions (liaison covalente, interactions hydrophobes, ioniques, *pi-stacking*, etc.) avec les ligands, au-dessus d'un certain seuil pour chaque type. Cependant, ces informations ne sont nativement pas présentes dans les fichiers PDB résultant du *docking* et il faut pour cela les calculer/prédire en utilisant un algorithme supplémentaire. Pour cette opération nous avons sélectionné le logiciel PLIP et avons tout juste commencé à tester son implémentation.<sup>456</sup> Concernant le type de GNN à utiliser à présent, nous avons choisi de nous tourner vers un système de *message passing*. Ce type de réseau est en pleine expansion dans les domaines de la chimie et de la biologie, notamment car il permet d'ajuster efficacement le poids des *nodes* et *edges* tout en prenant en compte un nombre important de caractéristiques de ces derniers (comme dans notre cas le numéro atomique, le type d'interaction, la longueur des liaisons, etc.). Plus précisément, nous nous sommes récemment intéressés à l'étude menée par Liu *et coll.* en 2022,<sup>457</sup> pour laquelle il a été développé un nouveau module GNN basé sur du *spherical message passing*. Au lieu d'utiliser des coordonnées cartésiennes absolues, ce système utilise la distance entre les *nodes* ( $d$ ), ainsi que les angles entre l'*edge* considéré et les autres (angle  $\theta$ ) et un angle de torsion ( $\varphi$ ) entre ces derniers et un plan formé par l'*edge* ciblé et un autre *edge*. Le message à faire passer entre les *edges* est enfin calculé à l'aide d'une nouvelle fonction dérivant de la fonction d'onde électronique, et utilisant les paramètres  $d$ ,  $\theta$  et  $\varphi$  (Figure 95).

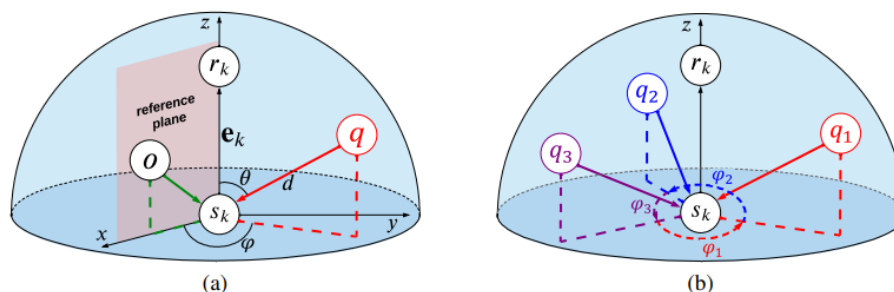


Figure 95 : (a) Schéma d'agrégation des messages pour le *spherical message passing* proposé par Liu *et coll.* (b) Illustration du calcul des angles de torsion dans l'architecture du *message passing*. (Illustration issue de Liu *et coll.*)<sup>457</sup>

Les auteur·rice·s affirment que de cette façon leur système est en mesure de mieux capturer les interactions 3D entre les atomes, ainsi que certaines caractéristiques physiques de ces dernières. Les premiers essais d'implémentation de ce réseau SphereNet étant très récent, je ne suis malheureusement pas en mesure d'en donner ici les premiers résultats, ceux-ci étant encore très balbutiants. Cependant, en conclusion de cette étude, nous avons bon espoir de pouvoir d'ici peu commencer à utiliser les données structurales de nos enzymes pour enrichir la compréhension de notre modèle général pour la prédiction de l'activité des transaminases de TAM(A). Les résultats que j'ai présentés ici l'ont également été lors d'une conférence dans le cadre de la 6<sup>th</sup> Machine Learning and AI in Bio(Chemical) Engineering Conference (6<sup>th</sup> MABC) à Cambridge (UK) et ont reçu un accueil très positif de la part de la communauté. Je tiens également à préciser que la très grande majorité de ces résultats sont issus du travail acharné de Guillaume Darlot, que je remercie beaucoup et félicite pour sa ténacité alors qu'il n'était qu'en première année d'école d'ingénieur.

**Résumé de ma contribution :** Pour ce projet, j'ai eu la chance de pouvoir réaliser moi-même plusieurs expérimentations, notamment à travers la programmation de certains des algorithmes décrits plus hauts. J'ai aussi eu l'occasion de coordonner le montage de plusieurs projets, comme les deux ANR PRCI et le projet PLASTILOOP que j'ai mentionnés. Cependant je me suis également beaucoup appuyé sur l'expertise de nombreux collaborateurs, plus experts que moi dans le domaine, ainsi que sur celle de plusieurs étudiants Centraliens, qui ont pour ainsi dire réalisé la majeure partie de la programmation. Néanmoins j'ai pu présenter ces travaux dans le cadre de deux événements scientifiques, lesquels ont été jugés positivement par la communauté, ce qui est encourageant quant aux approches que nous avons sélectionnées.

**Lien avec mon projet de recherche :**

Bien que n'étant pas au cœur de mon projet de recherche et du développement de la catalyse hybride, l'utilisation de l'apprentissage machine pourrait à mon avis être un très bon outil supplémentaire pour pouvoir 1) rechercher de nouveaux catalyseurs plus actifs et surtout compatibles entre eux, et 2) tenter de prédire les combinaisons enzymes-nanoparticules métalliques, mais également catalyseur-support afin d'en limiter le nombre à réaliser de manière expérimentale. Aussi, ces premiers travaux m'ont permis de commencer à me familiariser avec un tout nouveau domaine scientifique, que je trouve particulièrement enthousiasmant, me donnant accès à un panel de premiers outils utilisés notamment pour le travail autour des enzymes. Je compte également me former plus avant avec les algorithmes dédiés à la catalyse hétérogène, notamment à l'aide de plusieurs très bonnes revues sur le sujet que j'ai

déjà eu l'occasion de parcourir, et qui m'ont servi pour écrire ce mémoire. Ceux-ci pourront alors être entraînés à nouveau sur des données de criblage, notamment en profitant de la grande expertise de la plateforme REALCAT dans le domaine, ainsi que du Pr. Sébastien Paul (UCCS) avec lequel je collabore sur ce sujet.

À ce titre, ces premiers travaux m'ont également permis de développer plusieurs premières collaborations, désormais bien établies, notamment avec le Dr. Tao Jiang (E2P2L, Chine), le Dr. Mark Dörr (Université de Greifswald, Allemagne) et le Dr. Stefan Born (Université technique de Berlin, Allemagne) avec lesquels nous allons poursuivre ces travaux. J'ai également pu commencer à collaborer avec le Dr. Jérémie Zaffran (E2P2L, Chine) et le Dr. Bastien Casier (UCCS), avec lequel j'ai d'ailleurs organisé une journée thématique dédiée au *machine learning* dans la chimie à l'UCCS cette année. Ceux-ci sont spécialisés en chimie théorique, et en utilisation de l'intelligence artificielle pour ce domaine, et m'aideront pour l'optimisation de mes modèles, notamment afin de faire prendre en compte par ces derniers un maximum des principes physiques qui régissent les interactions entre les molécules. Je compte d'ailleurs tenter de développer avec Jérémie Zaffran un système de DFT adaptable au site actif de mes enzymes pour voir si cela ne pourrait pas améliorer la prédiction de leur réactivité. Pour finir, ma présence au 6<sup>th</sup> MABC m'a également permis de fortement étendre mon réseau de relation, en particulier dans le domaine du *machine learning*, et je compte bien le mettre à profit pour compléter les expertises que je ne pourrai pas acquérir, et pourquoi pas monter de nouveaux projets.

## Projet de recherche

Dans cette partie je vais brièvement vous présenter les travaux que je compte mener dans le cadre de ma thématique de recherche, ainsi que ceux que je n'ai pas encore mentionnés et qui s'inscrivent dans le cadre de projets financés en cours. Ayant déjà détaillé les concepts qui régissent les différents domaines scientifiques qui composent mon projet, je ne m'étendrai pas dans cette partie sur ces derniers, et ne mentionnerai que les quelques publications qui étayent les éléments précis que j'évoquerai.

### ***Catalyse hybride assistée par criblage à haut débit et intelligence artificielle : vers de nouveaux matériaux multi-catalytiques pour la valorisation de la biomasse***

#### **Conception de nouvelles voies de synthèse hybrides pour la valorisation de composés issus de la dégradation de la lignocellulose**

Comme je l'ai mentionné, je compte continuer sur ma lancée et proposer de nouvelles voies de valorisation des composés issus de la lignocellulose à l'aide de la combinaison de nanoparticules métalliques et d'enzymes, toutes deux supportées. Plus précisément, je compte dans un premier temps continuer mes travaux sur les dérivés furfurux, en continuant à travailler autour du HMF mais également du furfural, lequel peut aussi être obtenu par dépolymérisation de la biomasse. Je compte ainsi continuer à développer le couplage de réactions d'oxydation et d'amination des carbonyles afin d'obtenir des molécules aminées. À ce titre, je compte également commencer à introduire de la chiralité au sein de ces dernières, en profitant notamment de la très bonne stéréosélectivités des transaminases pour l'amine qu'elles produisent. Celle-ci devrait me permettre d'accéder à de nouveaux polymères ayant des contraintes structurales supplémentaire par polymérisation des furfurylamines, mais également d'ouvrir la porte à d'autres types d'applications comme dans le domaine thérapeutique. Pour réaliser cela il conviendra d'utiliser des dérivés asymétriques du HMF, substitués en position 3 et 4, dont certains ont déjà pu être synthétisés par l'équipe du Pr. Thierry Gefflaut (ICCF) et de la Pr. Marielle Lemaire (ICCF) avec lesquels je collabore. Une autre molécule issue de la pyrolyse de la biomasse que je compte valoriser, notamment en y introduisant une amine chirale est le lévoglucosane. Je compte ainsi tenter prochainement la synthèse de la lévoglucosénamine et de la lévoglucosénamine, en passant par les intermédiaires lévoglucosénone et lévoglucosanonone (dihydrolevoglucosénone) respectivement, lesquels peuvent être obtenues par déshydratation, et réduction, du lévoglucosane (Figure 96).

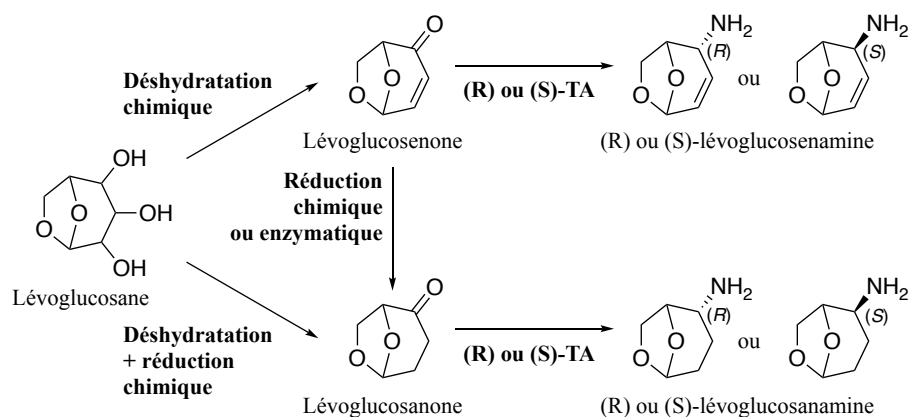


Figure 96 : Stratégie de synthèse de la (R) ou (S)-lévoglucosénamine et lévoglucosamine par combinaison d'une déshydratation chimique, une réduction chimique ou enzymatique et une amination enzymatique à partir du lévoglucosane.

(TA = transaminase)

Cette opération peut en effet être réalisée à l'aide d'un catalyseur chimique comme cela a déjà pu être démontré, notamment par le Pr. Fabio Bellot Noronha (UCCS) assez récemment,<sup>458</sup> avec lequel je collabore dans le cadre du projet MSCA DN DEMO. Le challenge sera ici de mettre au point des catalyseurs chimiques capables de travailler à basse température (< 80 °C), les systèmes actuels étant généralement au-dessus des 100 °C. Il faudra également rechercher de nouvelles transaminases, capables d'accepter ce type de substrats cycliques. Pour cela je compte faire appel à mes collaborations avec le Génoscope, et plus particulièrement la Pr. Véronique De Berardinis, pour un nouveau cycle d'exploration de la biodiversité. Je compte également mettre à profit nos nouveaux systèmes de prédiction de l'activité des transaminases pour voir si ceux-ci peuvent nous aider à trouver et sélectionner plus rapidement les séquences acceptant ces substrats. Comme précisé dans la Figure 96, il sera également possible d'envisager la réduction de la double liaison de la lévoglucosénone à l'aide d'une enzyme, comme une ène réductase (comme la *old yellow enzyme*), laquelle pourra également être intégrée dans un système hybride. A noter que la lévoglucosane est la molécule qui compose le cyrène, un solvant vert produit par l'entreprise CIRCA et qui a des applications dans les domaines de la pharmacologie et de la microélectronique notamment, en faisant une cible très intéressante pour le développement de systèmes hybrides.

Un autre type de système hybride que je compte développer concerne la régénération du donneur d'amine des transaminases que j'utilise à partir d'ammoniac. Un des reproches qui est souvent fait aux réactions de transamination est leur utilisation d'un donneur d'amine, qui devient sacrificiel dès lors que le co-produit carbonyle auquel il conduit n'est pas valorisable. Pour limiter cela, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin notamment d'utiliser des donneurs plus petits, comme l'isopropylamine, laquelle conduit à la production d'acétone qui permet de déplacer l'équilibre de la transamination par extraction du milieu sous vide. Néanmoins ce type de stratégie, quoique plus économe, ne permet pas de s'affranchir totalement de la perte en atome. Une solution plus efficace reviendrait à combiner une enzyme capable de recycler le coproduit carbonyle par amination de ce dernier avec de l'ammoniac comme source d'azote, le donneur d'amine n'étant plus utilisé qu'en quantité catalytique. Plusieurs familles d'enzymes de ce type ont récemment été reportées, comme certaines imines réductases<sup>459</sup> ou déshydrogénases.<sup>460</sup> Cependant celles-ci sont toutes dépendantes de l'utilisation du NAD(P)H comme cofacteur ce qui limite drastiquement leur utilisation au niveau industriel. A la place il serait donc envisageable d'utiliser un catalyseur chimique. Plus précisément, le Pr. Benjamin Katryniok (UCCS) a déjà travaillé sur l'élaboration de catalyseurs capable



d'effectuer ce type de réaction en phase gaz (Figure 97). Il serait alors intéressant de tenter le couplage de ces deux catalyseurs, ce qui permettrait d'aboutir à un procédé hybride de type liquide-gaz, système assez peu reporté en catalyse.

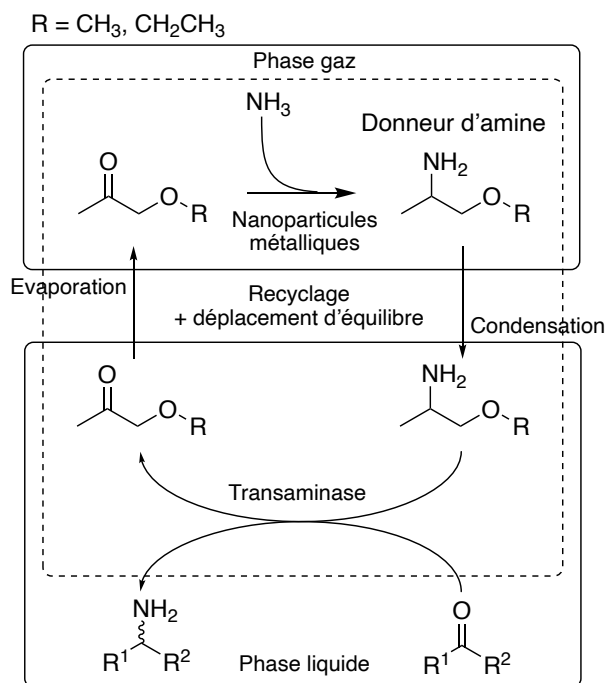


Figure 97 : Concept de procédé hybride pour la régénération du donneur d'amine nécessaire à la réaction de transamination à l'aide d'ammoniac comme source d'azote.

### Conception de nouveaux matériaux multi-catalytiques hybrides à base de *metal-organic frameworks* de la famille des NU-100x

La problématique qui est sûrement la plus importante à résoudre pour la création des MMCH à base de MOF et d'enzymes, concerne l'adéquation de la taille des pores/canaux avec ces dernières. Il s'agit en fait là du principal facteur limitant pour leur incorporation au sein du matériau et elle est également essentielle pour le contrôle de la diffusion des substrats jusqu'au site actif. En effet, nombre de MOF possèdent des pores dont le diamètre ne fait que quelques nanomètres tout au plus. Ceux-ci ne permettent alors que l'immobilisation de petites protéines dont l'intérêt en synthèse reste limité. Heureusement, plusieurs familles de MOF ont déjà été décrites comme présentant de bonnes capacités d'immobilisation d'enzymes de taille plus importante (Figure 98).

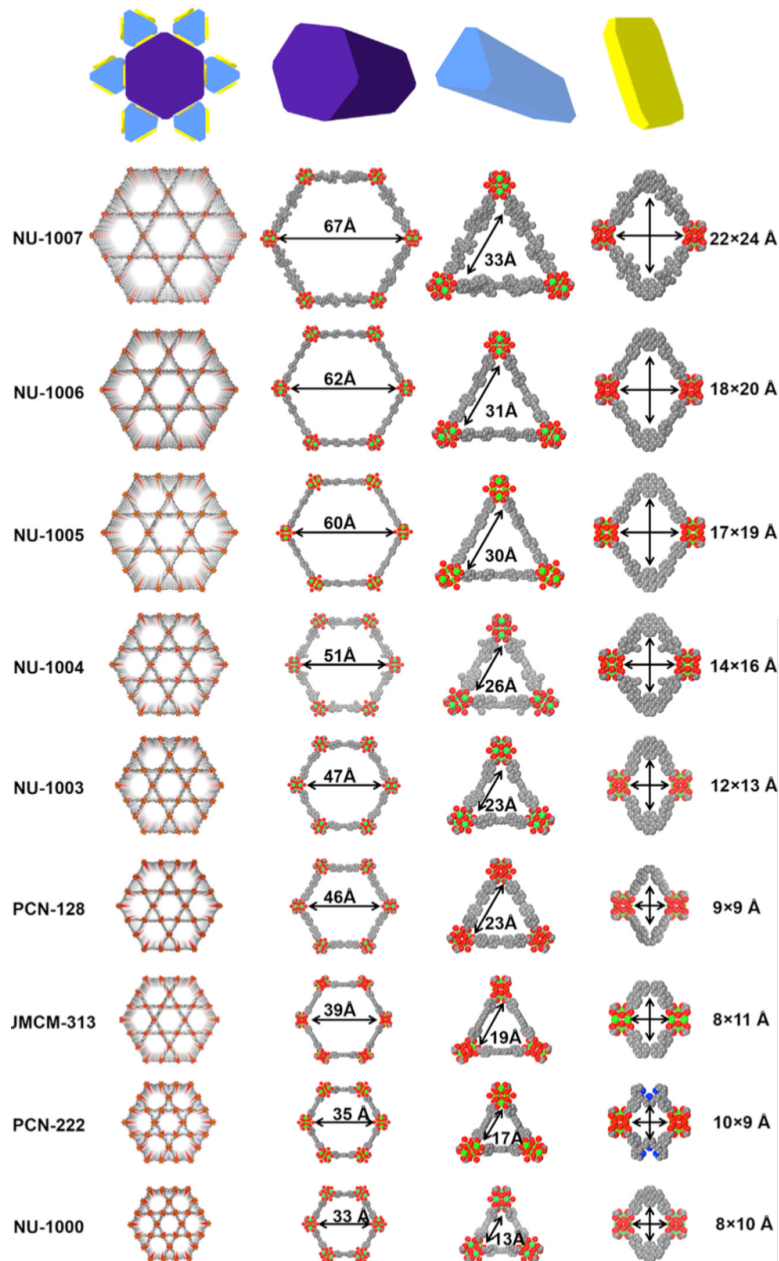


Figure 98 : Structures et dimensions de plusieurs « *metal-organic frameworks* » ayant été décrits pour l'immobilisation d'enzymes.

(Image issue de Li et coll., 2018)<sup>344</sup>

Avec des pores allant jusqu'à 62 Å, une première famille est composée des PCN-333 et PCN-888. Elle a été utilisée avec succès pour encapsuler la glucose oxydase et la peroxydase de raifort afin de produire un nanobioréacteur fonctionnel pour la détection du glucose.<sup>461,462</sup> La constante cinétique des enzymes immobilisées était équivalente ou supérieure aux enzymes libres et leur recyclage était grandement amélioré démontrant l'importance de l'effet du matériau sur leur repliement et stabilité. Avec des tailles de pores très modulables, la famille NU-100x pourrait également représenter une bonne candidate pour nos nanoréacteurs hybrides. Un exemple récent décrit l'immobilisation de la lactate déshydrogénase (LDH), une grande protéine qui transforme l'acide pyruvique en acide lactique.<sup>344</sup> Dans cette étude, la taille des

pores a été adaptée à l'enzyme. La LDH@NU-1007 résultante a montré une activité plus élevée que l'enzyme non immobilisée, et là encore, une recyclabilité beaucoup plus élevée. De manière intéressante, les MOF de la famille des NU-100x, où  $x = 5, 6, \text{ et } 7$ , acceptent de petites molécules comme des cofacteurs (NADH) dans leurs petits canaux triangulaires, ce qui facilite d'autant plus la diffusion des substrats au sein de la structure.<sup>344,463</sup> Un dernier avantage de cette famille à base de zirconium est sa stabilité accrue en solution aqueuse à *pH* neutre et l'absence d'éléments toxiques dans sa structure. Au vu de ces propriétés, et la mesure ou les ligands qui permettent leur production ne sont pas commerciaux, nous nous sommes intéressés avec mon collègue le Dr. Till Bousquet (UCCS), à mettre au point une voie de synthèse au laboratoire adaptée de celle décrite dans la littérature. Il nous a en effet été impossible dans un premier temps de convenablement reproduire cette dernière. Aussi, à travers le travail de deux stagiaires de Master 2, et en particulier celui de Loris Meziani cette année, nous venons d'obtenir en petite quantité le ligand permettant d'accéder au NU-1007. Cette synthèse repose sur un couplage de Suzuki entre le tétrabromopyrène et un bras organoboré, lequel est obtenu par une succession de couplages de Sonogashira (Figure 99).

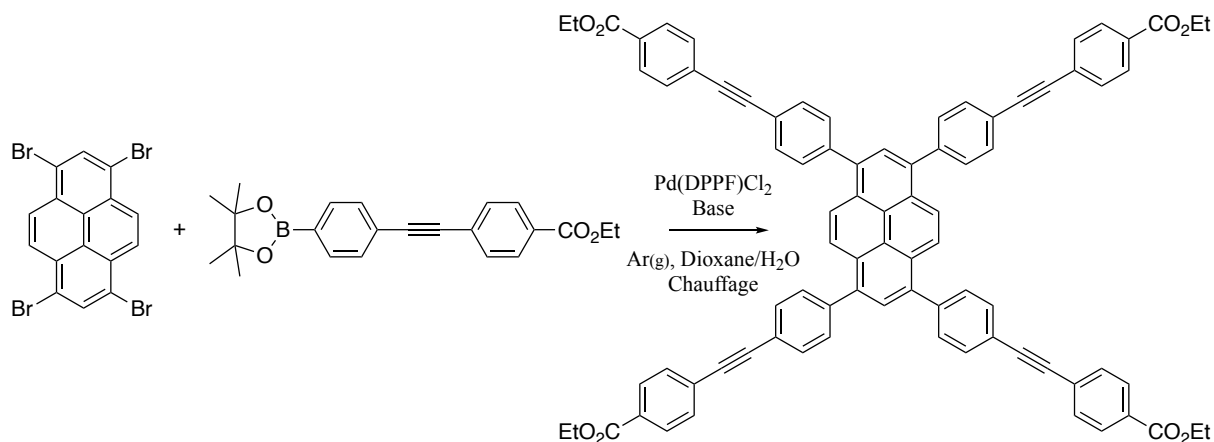


Figure 99 : Dernière étape avant déprotection de la synthèse du ligand du NU-1007, réalisée par couplage de Suzuki avec un catalyseur au Pd, sur le tétrabromopyrène et le 4-((4-(4,4,5,5-tetraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phényl)éthynyl)benzoate d'éthyle.

Nous allons donc à présent tenter la synthèse du MOF afin de pouvoir le caractériser entièrement en prévision de son utilisation pour l'immobilisation des transaminases. A noter qu'aucune enzyme de cette famille n'a pour le moment été immobilisée à l'intérieur d'un MOF, constituant donc une avancée intéressante en soi. Cependant, la quantité en ligand pour le moment obtenue ne sera pas suffisante pour tenter l'immobilisation, et il sera donc au préalable nécessaire d'en produire une quantité plus importante. Ces prochaines étapes devraient être réalisées dès 2024 avec un nouveau stage de Master 2 dédié. Une fois accomplies, nous pourrions également tenter d'immobiliser les nanoparticules d'or et de platine qui se sont montrées actives lors nos synthèses des furfurylamine au sein des canaux triangulaires du NU-1007, afin de constituer un premier MMCH combinant ces deux familles de catalyseurs (Figure 100). Pour cela je compte dans un premier temps tenter de réaliser l'incorporation des catalyseurs chimiques par imprégnation, laquelle sera ensuite suivie par l'ajout des enzymes dans les pores hexagonaux. Le désavantage de cette approche est que les nanoparticules ne seront pas toutes séparées de l'enzyme, une part d'entre elles s'immobilisant logiquement dans ces mêmes pores. Cela dit, lors de nos précédents travaux, nous avons plutôt observé une désactivation des nanoparticules par l'enzyme, et non l'inverse. Aussi, nous avons bon espoir que la transaminase immobilisée de cette façon, en présence du métal,

demeure active, et que nous puissions compter sur la fraction des nanoparticules immobilisée dans les pores triangulaire pour l'oxydation chimique. En alternative, si cela s'avère possible, nous essayerons également d'inverser les deux imprégnations, en utilisant notamment notre nouvelle transaminase (acc. num. UniProt B9AZ94), qui est stable dans des conditions de solvant et de pH plus larges que la Q7NWX4 (acc. num. UniProt) utilisée jusque-là, dans l'espoir qu'elle résiste à l'étape d'incorporation du catalyseur chimique, aidé par la stabilisation au sein du matériau.

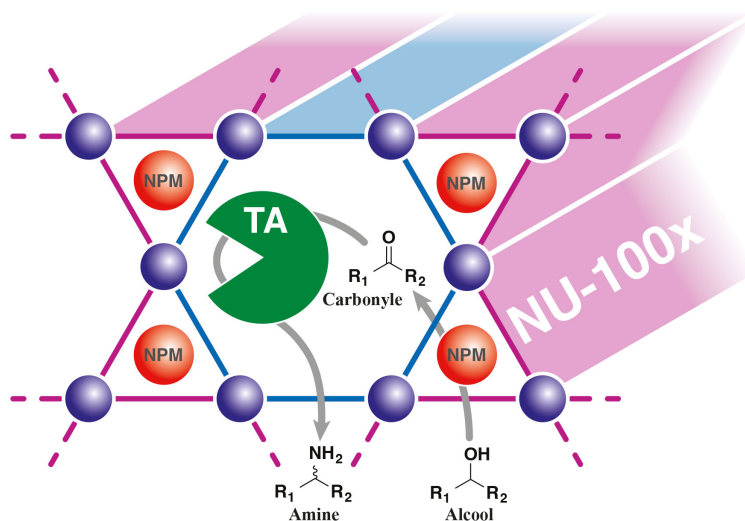


Figure 100 : Concept de matériau multi-catalytique hybride (MMCH) basé sur la co-immobilisation d'une transaminase (TA, vert) et de nanoparticules métalliques (NPM, rouge) au sein des canaux d'un *metal-organic framework* de la famille des NU-100x. Celui-ci sera ensuite utilisé pour la conversion d'alcools issus de la biomasse en amines correspondantes.

Évidemment je ne compte pas me limiter à l'utilisation de ce MOF pour la conception des MMCH. A travers une nouvelle collaboration entamée en 2023 avec la Dr. Clémence Sicard (ILV) qui est une experte de la synthèse de MOF et de leur utilisation pour l'immobilisation d'entité biologiques (et notamment récemment de microorganismes), nous avons commencé à voir si nous ne pouvions pas incorporer les transaminases utilisées dans les procédés hybrides décrits précédemment au sein d'autres familles, notamment par coprécipitation cette fois, à l'aide de l'approche spécifique qu'elle a développée. L'intérêt de cette approche est qu'elle s'effectue dans des conditions douces, en milieu aqueux tamponné, ce qui est compatible avec la rétention de l'activité des enzymes. Ainsi nous sommes actuellement en train de voir si le MIL-100(Fe) ne pourrait pas être un bon support pour les transaminases. L'activité du biomatériau sera ainsi mesurée, et comparée à celle de l'enzyme libre, et immobilisée sur les supports EziG, notamment dans le cadre de nos procédés hybride de synthèse des furfurylamines. Par la suite, nous étendrons notre étude à d'autres familles de MOF, toujours en envisageant la coprécipitation de l'enzyme plutôt que son encapsulation, avec pour intérêt principal de limiter les risques de relargage. En revanche nous ferons très attention au gradient de diffusion des substrats, ce point étant évidemment décrit comme le plus limitant pour ce type d'immobilisation. Enfin, je poursuis également en parallèle nos premiers essais de co-immobilisation de nanoparticules et d'enzymes dans des MOF. Plus particulièrement, à travers le financement d'un Partenariat Hubert Curien (PHC) *Amadeus* que nous venons d'obtenir avec la Pr. Mélanie Hall (Université de Graz, Autriche), nous allons nous atteler avec son étudiant en thèse, Matteo Aleotti, à l'immobilisation des enzymes que celui-ci développe à la surface de l'UiO-66-NH<sub>2</sub> ainsi que de plusieurs autres MOF synthétisables à partir de ligands commerciaux ayant déjà été décrit pour la conception de

biomatériaux. Ceux-ci seront, au préalable, utilisés pour l'immobilisation de nanoparticules métalliques (Pd et Pt) chargées de réaliser des réactions d'hydrogénation de divers groupements, lesquelles seront couplées avec la catalyse hybride pour proposer de nouveaux procédés hybrides. A ce titre, je me rendrai en novembre prochain à Graz et accueillerai juste après Matteo à Lille pour commencer les synthèses.

Le second challenge qui régira la synthèse de ces MMCH repose sur la mise au point de systèmes de caractérisation efficace des interactions entre l'enzyme, les nanoparticules métalliques et le MOF, et surtout de leur localisation respective afin de vérifier (et contrôler) leur compartimentation, objectif principal recherché. Or ces matériaux sont connus pour être difficiles à caractériser (structure complexe, grande maille cristalline...), et de très nombreuses méthodologies ont déjà été mises au point dans cette optique.<sup>309,314</sup> Plus encore, lorsque ces derniers incorporent des espèces exogènes (enzymes, MNP, etc.) les chercheurs doivent multiplier les techniques d'analyse et proposer des approches complémentaires complexes. Dans ce contexte, la plateforme REALCAT m'offre déjà accès à un panel de techniques que j'ai précédemment décrites. L'analyse BET (*Brunauer-Emmett-Teller*), également disponible au laboratoire, me permettra d'aller plus loin dans la détermination la surface spécifique ainsi que la taille des pores générés dans le matériau. Plus encore, cette technique peut s'avérer très utile pour étudier l'incorporation des espèces exogènes comme les enzymes, en étudiant la taille des pores après immobilisation, ces derniers étant alors partiellement remplis suivant la taille des espèces utilisées.<sup>103,304</sup> L'analyse structurale du matériau produit sera également complétée grâce à la microscopie électronique à balayage (MEB),<sup>359</sup> pour l'étude de la topographie du matériau dans le cas où les catalyseurs seraient immobilisés à sa surface. Mais je compte surtout faire appel aux appareils de caractérisation fine des solides disponibles au sein de l'institut Chevreul dont l'UCCS fait partie, ainsi qu'à l'expertise des ingénieurs et chercheurs qui les pilotent, notamment pour l'observation de l'immobilisation des nanoparticules métalliques. Concernant les enzymes plus spécifiquement, l'utilisation de la microscopie (*Transmission Electron Microscopy* (TEM)) devrait aider à identifier la localisation de ces dernières au sein du matériau dans la mesure où elles auraient été au préalable marquées, avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) par exemple.<sup>360</sup> Je compte d'ailleurs bénéficier de la présence d'un HR-TEM Titan sur le site Lillois pour obtenir une résolution élevée lors de ces analyses afin de mieux pouvoir distinguer les éléments à l'intérieur de la structure du MOF. De la même manière, la microscopie confocale à balayage laser (MCBL) pourra s'avérer très utile pour étudier la localisation de l'enzyme comme cela a déjà été démontré.<sup>225</sup> La quantité d'enzymes incorporée pourra être quant à elle déterminée par analyse thermogravimétrique (ATG), ainsi que par analyse élémentaire CHNOS, ou plus simplement par quantification de la quantité de protéine non immobilisée par dosage de Bradford. Pour finir, je compte également tenter d'utiliser le dichroïsme circulaire afin d'observer le changement de repliement de la protéine une fois incorporée au matériau, pour essayer d'en conclure le type d'interaction entre les deux, et le relier à l'activité de l'enzyme. Quoique visiblement difficile à mettre en œuvre, cette approche a en effet elle aussi été décrite comme utile pour ce type d'analyse lors de l'immobilisation précédente d'enzymes dans des MOF.<sup>225,317,361</sup> Ne disposant pas de l'appareil nécessaire à Lille, je compte faire appel à ma nouvelle collaboration avec la Dr. Nadia Babero (Université de Turin, Italie) dans le cadre du MSCA DN *DEMO*, qui a elle aussi déjà travaillé sur l'immobilisation d'enzymes au sein des MOF, et qui est en mesure de faire ce type d'analyse.

Enfin, je compte tout particulièrement exploiter la compétence particulière de l'UCCS dans le domaine de la spectroscopie RMN appliquée à la caractérisation des MOF. L'équipe RM2I responsable de cette thématique développe en effet cette technique pour l'identification du matériau et des défauts présents dans sa structure, mais aussi pour la détermination des interactions que ce dernier peut avoir avec les espèces chimiques qui y sont immobilisées. On citera par exemple l'observation récente de la « respiration » du

MIL-53(Al). Au cours de cette étude, la Dr. Pourpoint (UCCS) et son équipe ont pu mesurer les interactions présentes entre l'acide téréphtalique, sous forme de ligand « libre » issu de la synthèse du MOF, et la charpente du MOF grâce à une technique RMN des solides (ssNMR) « *Rotational-Echo Saturation-Pulse Double-Resonance* » (RESPDOR) en RMN du solide recouplée avec de la « *Simultaneous Frequency and Amplitude Modulation* » (SFAM) entre le  $^{13}\text{C}$  et l' $^{27}\text{Al}$ .<sup>336</sup> Ainsi, elles-ils ont pu confirmer la structure tridimensionnelle du MOF déterminée par DRX, et ont expliqué la taille des pores du MOF lorsque ce ligand « libre » y est encore incorporé. Cette technique sera très intéressante pour mesurer les interactions entre l'enzyme incorporée et les métaux présents dans la charpente du MOF, et ainsi comprendre, voire prédire, l'encrage de cette dernière au sein des canaux du matériau. D'autant plus que d'une enzyme à l'autre, la charge de surface peut varier de manière importante, et il est alors essentiel d'envisager l'incorporation des meilleurs métaux, dans les états d'oxydation adéquats, afin d'espérer obtenir une interaction maximale avec la protéine, et ainsi une meilleure rétention. J'ai bien évidemment conscience que la complexité des signaux générés par les enzymes ne rendra pas cette tâche aisée, surtout lorsque l'on s'intéresse au  $^{13}\text{C}$  et que ces dernières sont intégrées dans des supports carbonés comme les MOF. Pour résoudre ce problème, il faudra essayer de ne détecter que l'enzyme en enrichissant les chaînes peptidiques en  $^{13}\text{C}$  par croissance des microorganismes sur des substrats ayant subi des échanges isotopiques. Une alternative plus prometteuse consistera sûrement à faire de la RMN sur le  $^{15}\text{N}$ , qui, malgré son abondance naturelle faible, sera sûrement détectable au vu de la grande quantité d'atomes d'azote présente dans les chaînes peptidiques des enzymes (400-500 atomes pour les enzymes que j'étudie). Bien évidemment, je testerai aussi un enrichissement des enzymes en  $^{15}\text{N}$  afin de voir si nous pouvons mieux identifier leur structure au sein des MOF de cette façon. Enfin, la spectroscopie RMN est une technique de caractérisation également connue pour déterminer le repliement des protéines et devrait permettre de l'observer pour l'enzyme au sein des canaux.<sup>464,465</sup> Le centre RMN de l'université de Lille comprend d'ailleurs des spectromètres à très hauts champs 18,8 et 21,1 T (correspondants à une fréquence de Larmor  $^1\text{H}$  de 800 et 900 MHz, respectivement) et accueillera en 2022 un spectromètre 28,2 T (fréquence de Larmor  $^1\text{H}$  : 1200 MHz). Ces très hauts champs magnétiques permettent une augmentation de la sensibilité et de la résolution en comparaison avec des spectromètres plus conventionnels. Il s'agit donc d'équipements particulièrement adaptés à la caractérisation de la structure des protéines et des noyaux quadripolaires présents dans les MOF, dont je profiterai grandement pour accélérer la caractérisation de mes MMCH. En résumé (Figure 101), je commencerai donc par caractériser les MOF, une fois synthétisés, de la manière la plus fine possible afin d'obtenir une base de référence. Armé de cette variété de techniques d'analyse, je serai en mesure de pouvoir franchir rapidement cette première étape. En parallèle, je caractériserai plus en détail les enzymes que je compte incorporer, avec au besoin, la réalisation de leur analyse cristallographique pour confirmer leur structure 3D si cette dernière n'est pas disponible dans les bases de données. A celle-ci, j'associerai leur analyse par RMN afin d'obtenir le second référentiel dont j'ai besoin. Je terminerai enfin par étudier le matériau complet une fois les enzymes incorporées, de manière à identifier clairement les interactions mises en œuvre entre les deux espèces, en utilisant notamment sur les techniques en RMN développées par Frédérique Pourpoint. Évidemment, au besoin, je n'hésiterai pas à faire appel à des techniques complémentaires, à commencer par une collaboration avec une équipe spécialisée dans la cristallographie des protéines. Je reste également conscient que ce type développement devra se faire sur le temps long, mais il me semble représenter un atout non négligeable pour pousser la recherche en catalyse hybride vers la conception d'un plus grand nombre de MMCH.

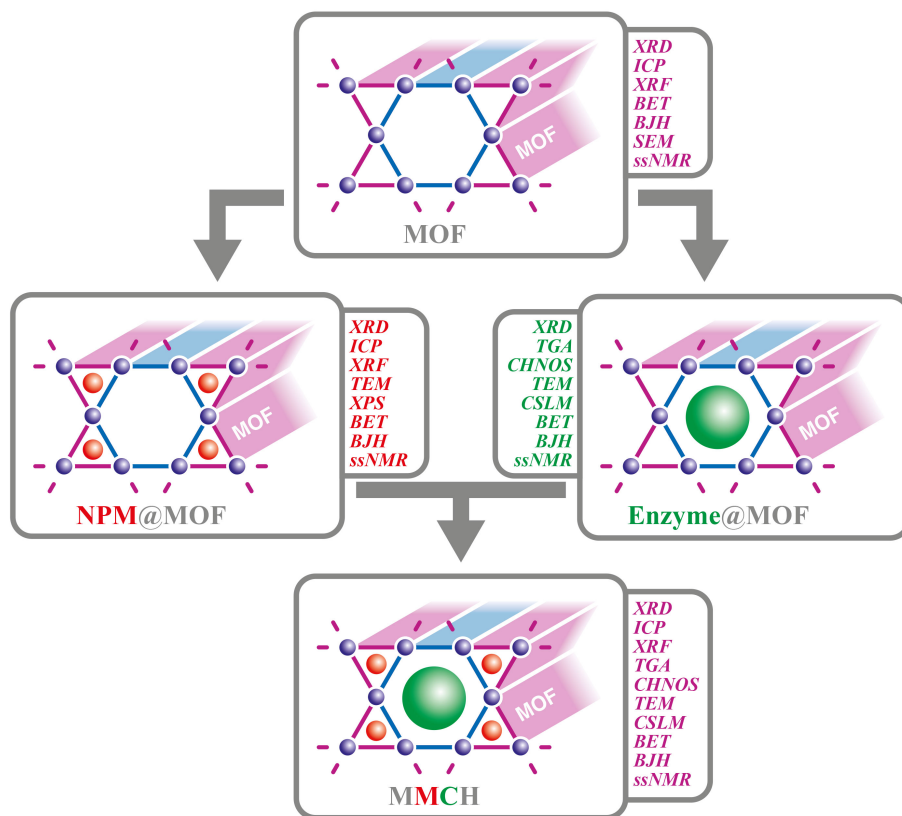


Figure 101 : Résumé des principales méthodes de caractérisation utilisées pour l'analyse et la compréhension des interactions entre les éléments composant un MMCH à base de MOF.

(BET = Brunauer-Emmett-Teller analysis, BJH = Barrett-Joyner-Halenda analysis, CHNOS = Carbon, Hydrogen, Nitrogen, Oxygen and Sulfur quantification, CSLM = confocal laser scanning microscopy, ICP = Inductively coupled plasma analysis, SEM = surface electron microscopy, TEM = Transmission electron microscopy, TGA = Thermogravimetric analysis, ssNMR = solid-state nuclear magnetic resonance, XPS = X-ray photoelectron spectroscopy, XRD = X-ray diffractometry, XRF = X-ray fluorescence)

### **Prédiction de la capacité d'immobilisation d'enzymes sur des *metal-organic frameworks* et des interactions en découlant, par *machine learning* et criblage haut débit.**

La catalyse chimique hétérogène a historiquement connu un développement important, une très grande partie des catalyseurs utilisés aujourd'hui dans des procédés industriels étant immobilisés sur support solide comme je l'ai déjà mentionné. En revanche, ce n'est clairement pas le cas pour les enzymes, dont l'immobilisation reste encore un des principaux défis, notamment pour une transposition vers le domaine industriel.<sup>365,466</sup> Comme je l'ai également mentionné, classiquement, et presque systématiquement, l'immobilisation des enzymes se fait par approche empirique, basée sur des analyses au cas par cas et de nombreux cycles d'essais-erreurs, parfois aidés par l'utilisation de robots comme sur la plateforme REALCAT. Une alternative prometteuse pourrait alors reposer sur l'utilisation d'algorithmes de *machine learning* pour mettre en œuvre une approche prédictive plutôt que rétrospective de la même façon que j'essaie de le faire concernant l'activité des enzymes. Au vu des avancées récentes dans le domaine, il y a tout lieu de croire que de tels outils seront capables dans un avenir assez proche de prédire les couples idéaux catalyseur+matériau à utiliser pour 1) optimiser leur activité catalytique sur la plus large gamme

possible de conditions opératoires et 2) les faire cohabiter de manière optimale avec différents catalyseurs. Cependant, si des algorithmes qui s'intéressent à la prédiction de la sélection du matériau support sont effectivement en cours de développement en catalyse chimique,<sup>63,467-469</sup> ce n'est pas encore le cas en catalyse enzymatique. En effet, et de l'aveu même de la communauté, la compréhension et la prédiction rationnelle des mécanismes régissant l'immobilisation des enzymes représente actuellement un "vide" en recherche.<sup>470</sup> Très peu d'outils bio-informatiques ont été développés à ce jour,<sup>471</sup> et seules 3 publications mentionnent des tentatives d'utilisation du *machine learning* à cette fin.<sup>472-474</sup> Il convient de noter que même dans le domaine de la catalyse chimique, l'utilisation de ce type d'algorithme pour la prédiction de nouveaux catalyseurs supportés en est encore à un stade très expérimental. Dans les deux cas, le principal goulot d'étranglement semble être, comme pour la prédiction de l'activité enzymatique, le manque de données normalisées, homogènes et, surtout, validées expérimentalement, en particulier pour l'immobilisation des catalyseurs biologiques. En chimie, les jeux de données dépassent rarement quelques centaines d'essais, et en biocatalyse, les jeux de données publics créés spécifiquement à cet effet sont tout simplement inexistantes. Dans le meilleur des cas, les algorithmes développés se basent donc exclusivement sur les résultats de publications éparses et sur des bases de données internationales. Des résultats très intéressants ont été obtenus de cette manière, mais il semble urgent d'envisager la production de grands ensembles de données expérimentales en bio- et en catalyse hybride, et de les exploiter pour comprendre et prédire l'immobilisation des enzymes sur des supports solides, et par la suite leur co-immobilisation avec des catalyseurs chimiques.

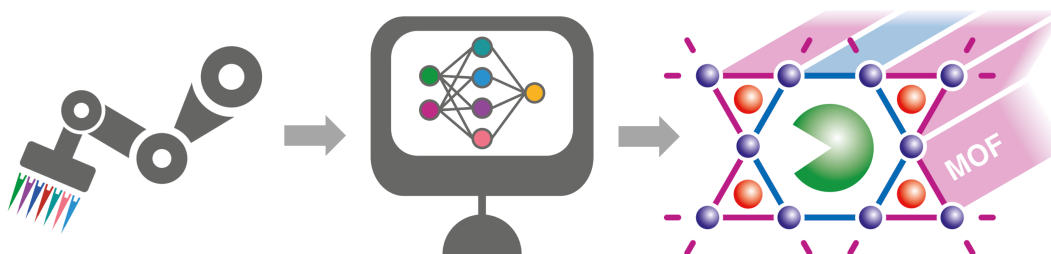


Figure 102 : Schéma simplifié de l'approche combinant des stratégies de criblage haut débit et l'utilisation d'algorithmes de machine learning pour la conception de nouveaux MMCH à base de MOF.

C'est pourquoi je compte tenter de concilier les différentes thématiques que j'ai détaillées dans ce mémoire, afin de développer une approche systématique, assistée par l'apprentissage automatique et le criblage à haut débit, pour la sélection prédictive du meilleur couple enzyme+matériau afin de maximiser l'activité et la stabilité des biomatériaux générés. Cette approche pourra par la suite être étendue à la prédiction de la co-immobilisation d'enzymes avec des nanoparticules métalliques pour le développement plus efficace de nouveaux catalyseurs hybrides. En relation avec mes expérimentations précédentes, je ne me concentrerai ici que sur l'utilisation de MOF comme matériau, ce qui me permettra de limiter la complexité du problème à un petit nombre de paramètres homogènes. De même, pour cette étude, j'ai l'intention de limiter le nombre de paramètres à prédire au taux d'immobilisation, au pourcentage d'activité maintenue, à la stabilité thermique (thermoactivité et thermostabilité) et à la recyclabilité (nombre de cycles) des biomatériaux. En ce qui concerne les méthodes d'immobilisation, je me concentrerai principalement sur l'immobilisation non covalente (adsorption de surface et imprégnation des pores), ainsi que sur les méthodes covalentes simples telles que celles basées sur le glutaraldéhyde ou les espaceurs époxydiques. En ce qui concerne les couples enzyme+MOF testés, l'une des principales limites des études basées sur la littérature est que les articles disponibles ne concernent que quelques familles restreintes d'enzymes (lipase, glucose oxydase, horseradish peroxydase, etc.) comme nous l'avons évoqué, et de MOF



(ZIF-8, UiO-66 et MIL-100). L'augmentation de la diversité de ces couples est donc cruciale pour diversifier les applications en synthèse, mais aussi pour mettre en évidence les descripteurs qui permettront aux futurs algorithmes d'établir la corrélation entre les caractéristiques des enzymes et des MOF et les paramètres des biomatériaux produits.

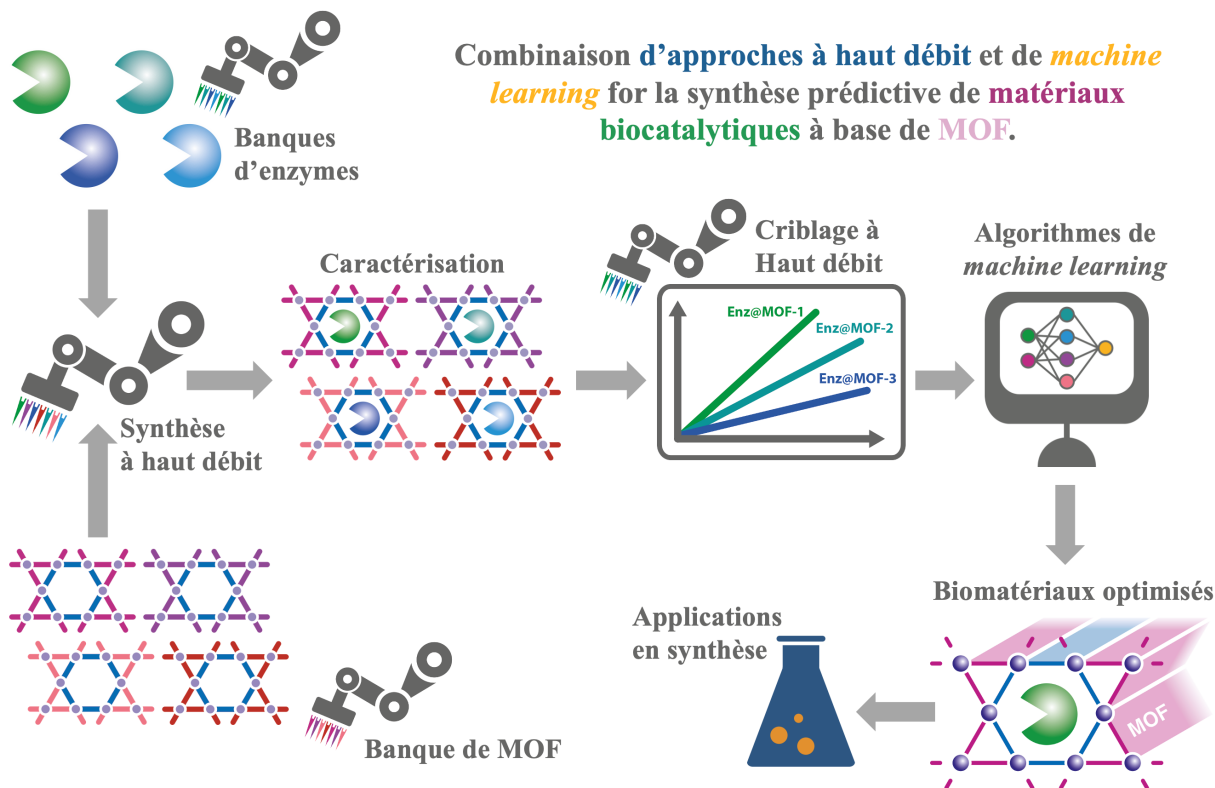


Figure 103 : Stratégie détaillée combinant des approches à haut débit et des algorithmes de *machine learning* pour la synthèse prédictive de matériaux biocatalytiques à base de MOF.

L'approche que je compte mener pour répondre à cette question, détaillée en Figure 103, pourra être découpée en 6 phases distinctes. La première consistera en la création de deux banques aussi diverses que possible, une pour les enzymes et une pour les MOF. Pour les enzymes, je compte faire appel à l'approche utilisée dans le cadre de mes précédents partenariats avec la Pr. Véronique De Berardinis (Génoscope). Cette fois, la méthode de sélection intégrera toutes les familles d'enzymes présentes dans [UniProt](#), en veillant à maximiser la diversité sur plusieurs critères (morphologie globale, point isoélectrique, hydrophobicité de surface, structure quaternaire, etc.), notamment à l'aide d'outils bio-informatiques classiques ou avancés tels que [Colabfold](#)<sup>417</sup> et [CapiPy](#).<sup>471</sup> La banque de MOF sera constituée d'un maximum de matériau commerciaux ou dont les ligands le sont. L'objectif ici sera d'explorer tous ceux qui sont déjà facilement accessibles et qui ont une stabilité au moins partielle dans l'eau (ZIF-8, UiO-66/67, MIL-96/100/101, PCN-128/PCN-222, MOF-801/841, DUT-67, etc.),<sup>339</sup> tout en maximisant la diversité de leurs propriétés physico-chimiques en variant leurs métaux (Zr, Cr, Fe, Al), mais aussi leurs ligands, pour obtenir des matériaux avec différentes fonctions chimiques libres à leur surface (acides carboxyliques, acides sulfoniques, amines, carbonyles). Pour m'assister dans la création de cette bibliothèque, je compte m'appuyer sur ma nouvelle collaboration avec la Pr. Unni Olsbye et la Pr. Petra Agota Szilagy (Université d'Oslo, Norvège), entamée cette année dans le cadre du MSCA DN *DEMO*. Je profiterai également de l'expérience récemment acquise concernant la synthèse de MOF à haut débit sur la plateforme REALCAT

pour pouvoir l'appliquer aux autres familles. Une fois les bibliothèques créées, la seconde phase de cette étude réalisera l'immobilisation des enzymes sur et dans les MOF, là encore en utilisant l'équipement à haut débit de la plateforme REALCAT. Afin de préparer au mieux la génération d'ensembles de données homogènes pour le ML, des méthodes robotiques standardisées seront mises en place à la fois pour la production des bibliothèques et pour l'immobilisation des enzymes sur les MOF. L'efficacité et la robustesse des méthodes de synthèse seront ensuite évaluées dans la troisième phase du projet, grâce au déploiement du panel de techniques que j'ai développées dans la partie précédente de mon projet, et qui seront disponibles à ce moment-là. Celles-ci seront donc utilisées à la fois pour la caractérisation isolée des enzymes (taux d'expression, activité et stabilité sous forme libre, etc.) et des MOF (composition, structure cristalline, surface spécifique, taille des pores, etc.), mais aussi des biomatériaux synthétisés. En ce qui concerne ces derniers, nous étudierons l'évolution des paramètres énumérés ci-dessus, mais aussi plusieurs paramètres supplémentaires susceptibles d'influencer fortement l'activité enzymatique, qui ne sont généralement pas rapportés dans la littérature, tels que l'orientation/le degré d'exposition du site actif de l'enzyme sur le MOF, ou les types d'interactions entre la surface de l'enzyme, le solvant et le matériau. Pour cette partie, j'ai l'intention de faire appel plus particulièrement à l'approche par RMN du solide que j'ai décrite plus haut. Je compte également renforcer ma collaboration avec Dr. Clémence Sicard (ILV), qui possède une longue expérience en caractérisation de biocomposites à base de MOF. Parallèlement à la caractérisation des matériaux et des catalyseurs, l'activité de ces derniers sera mesurée par criblage à haut débit dans la phase 4, en utilisant le panel de tests biochimiques que j'ai contribué à développer sur REALCAT. Là encore, nous assurerons l'homogénéité et la reproductibilité des données à l'aide de robots mais aussi avec la mise en place de seuils de sélection statistiques. Je compte également mettre à profit mon implication récente dans le développement du standard EnzymeML,<sup>475-477</sup> projet mené par le Pr. Juergen Pleiss (Université de Stuttgart, Allemagne), qui permet d'encoder les données de tests enzymatique dans un format uniforme et surtout lisible par des machines (comprendre ici par des programmes informatiques). A ce titre je travaille d'ailleurs avec son équipe à la transposition de ce standard à des systèmes compatibles avec du haut débit afin de minimiser l'implication des utilisateur·ice·s et la recopie manuelle des données. Toujours dans le but de maximiser la combinaison ultérieure d'enzymes avec des nanoparticules métalliques pour des réactions hybrides, les tests catalytiques seront effectués à différentes températures, en visant la plus élevée possible, notamment pour déterminer la température de dénaturation des enzymes, qu'elles soient libres ou immobilisées. Une fois les premiers ensembles de données générés, la phase 5 du projet se concentrera sur l'entraînement des différents algorithmes de *machine learning*. Tout d'abord, nous testerons des algorithmes déjà décrits dans la littérature, tels que ceux basés sur des arbres de décision ou des processus de régression gaussienne. Pour ce faire, nous utiliserons les hyperparamètres également déjà décrits. Cette première étape servira de base de comparaison puis de test des algorithmes d'apprentissage profond, afin de pouvoir utiliser des descripteurs plus complexes dans la seconde étape, à commencer par la structure 3D des enzymes, leur positionnement par rapport au matériau, etc. Pour cela, j'ai l'intention de tirer parti de mon travail actuel avec le Dr. Stefan Born (Université Technique de Berlin, Allemagne), le Dr. Tao Jiang (E2P2L, Chine) et le Prof. Pascal Yim (Centre de Recherche en Informatique, Signal et Automatique de Lille, CRISAL) sur la prédiction de l'activité des transaminases, et notamment des GNN que nous commençons à développer. Nous essaierons d'utiliser des techniques d'apprentissage par transfert afin profiter également du développement récent de réseaux de grande taille formés dans des domaines connexes. Enfin, nous validerons ces modèles, et l'ensemble de l'approche à l'aide de plusieurs cas expérimentaux appliqués, à commencer par la recherche de la combinaison transaminase+MOF optimale pour la synthèse hybride de nos furfurylamines, si possible en tentant de nous rapprocher d'une température

de réaction proche des 90 °C afin de voir jusqu'où nous pouvons pousser notre système. Je terminerai par préciser qu'une toute première étude a récemment été publiée par Chai *et coll.* sur la prédiction de biocomposites à base de MOF,<sup>474</sup> basée évidemment sur des données de la littérature, mais qui a déjà donné des résultats très prometteur, me donnant bon espoir quant à la faisabilité de ce projet.

### **Projets annexes liés ou non à mon activité de recherche principale**

Évidemment, je compte également poursuivre mon implication dans de nombreux projets en cours ou qui sont en train de démarrer sur des thématiques connexes ou éloignées aux concepts que j'ai présentés juste avant. En particulier, je participe depuis 2022 à la chaire ANR-Solvay-Centrale Lille PLASTILOOP2.0, à la coordination de laquelle je participe auprès du Pr. Sébastien Paul (UCCS). Ce projet vise à la dégradation biologique, à l'aide de microorganismes et des enzymes qu'ils sécrètent, de polymères aromatiques pétrosourcés, afin de conduire à la formation d'aromatiques branchés. Ceux-ci seront à leur tour fonctionnalisés de manière à les rendre à nouveau polymérisables, de manière à pouvoir être réutilisés selon une approche *drop-in* dans les procédés de Solvay. Cette fonctionnalisation sera faite par catalyse chimique et enzymatique, puis hybride si nous le pouvons, à travers deux thèses que je co-encadre. Le projet s'appuiera fortement sur nos précédentes réalisations, pour la catalyse enzymatique, chimique et hybride d'une part, mais également en *machine learning*, lequel sera mis à profit pour la recherche plus efficace de nouveaux catalyseurs. En parallèle débute également le projet sur financement de type Marie Skłodowska-Curie Actions Doctoral Network (MSCA DN) auquel je participe et pour lequel je suis le référent scientifique pour la partie lilloise avec le Pr. Franck Dumeignil (UCCS). Ce projet, intitulé *DEMO*, pour *Discovery of efficient Enzyme-like Metal Organic frameworks to activate biomethane at low temperature*, vise à 1) encapsuler plusieurs familles enzymes capables d'oxyder les alcanes à courtes chaînes au sein de MOF, avec comme cible prioritaire la conversion du biométhane en méthanol ; 2) s'inspirer du site actif de ces enzymes et de leurs interactions avec les MOF pour concevoir de nouveaux matériaux présentant des centres actifs métalliques, pour la même application ; 3) comparer les performances, les avantages et les faiblesses des deux types de catalyseurs, afin d'envisager à terme la possible combinaison des deux ; et 4) développer l'utilisation en flux continu des deux types de catalyseurs générés à l'aide de nouveaux réacteurs. Ce faisant, ce projet fera lui aussi appel à un grand nombre des concepts présentés dans ce mémoire, et en particulier la création de banques de nouvelles enzymes par exploration de la diversité, en partenariat avec la Pr. Véronique de Berardinis (Génoscope) qui participe également au projet et avec laquelle nous allons travailler à l'étude de nouvelle méthane monoxygénases solubles. D'autres projet viennent s'ajouter à ceux-ci, dont plusieurs avec des industriels de la région, notamment pour le criblage et l'optimisation de protéines et d'enzymes.

### **Participation au déploiement de la science ouverte et de la recherche participative.**

Pour terminer cette partie concernant mon projet de chercheur, j'aimerais mentionner rapidement ma forte volonté à participer au déploiement du concept de science ouverte. Je suis en effet intimement convaincu que le principal enjeu de la science de demain n'est plus le développement technologique en lui-même, mais la façon dont nous échangeons, communiquons et produisons les connaissances qui le permette et le favorise. Déjà fortement souligné avant, la crise du COVID en 2020 n'a fait que rendre plus criant le manque évident de transparence, d'accessibilité et de diffusion de la science par la communauté scientifique et les acteurs qui gravitent autour, afin que la connaissance soit accessible à tou-te-s, mobilisable par les médias et les décideurs, et plus répandue que la désinformation. Ce manque de diffusion dans la société

dessert non seulement les chercheur·se·s qui n'ont pas accès à tout la connaissance disponible à un instant *t* dans leur domaine, principe pourtant censé être à la base de la recherche scientifique, celle-ci devant pouvoir remettre en question et construire sur l'existant. Ceci s'accompagne également d'une inégalité croissante entre les laboratoires du monde entier, les pays riches étant, encore plus qu'avant, favorisés par rapport aux pays en développement, lesquels se retrouvent désormais dans la difficulté d'accéder aux résultats de la recherche, mais également de publier leurs propres travaux en partie à cause des frais d'APC (*Article Processing Charges*). Comme cela a déjà pu être discuté et démontré, ce système favorise également l'apparition d'erreurs dans les données de la littérature, celles-ci n'étant presque jamais vérifiées expérimentalement à cause de leur accessibilité limitée, et la pression à publier poussant les chercheur·se·s à sortir leurs travaux plus rapidement au détriment parfois de vérifications supplémentaire. Sans parler de l'augmentation du nombre de plagiat, ou de l'invention de résultats, certains cas ayant publiquement défrayé la chronique durant la crise COVID. Ajoutons à cela que les chercheur·euse·s ne sont pas les seul·e·s perdant·e·s du manque de transparence des résultats scientifiques. Les citoyen·ne·s sont également très fortement impacté·e·s par ce problème. A l'heure où on observe une augmentation de l'obscurantisme, et dans une certaine mesure du complotisme, là encore mis en lumière par la crise du COVID ou la montée de l'extrême droite dans plusieurs pays occidentaux, il apparaît urgent pour la communauté scientifique de rendre ses découvertes les plus accessibles possibles aux citoyen·ne·s mais également de les accompagner dans leur appréhension de celles-ci afin de recentrer le débat sur des faits.

C'est pour toute ces raisons que plusieurs chercheur·se·s et institutions, en particulier européennes, se sont associé·e·s afin de monter des groupes de réflexion et de travail ayant pour objectif commun de rendre la science plus ouverte et plus reproductible. Intimement convaincu du bien-fondé et du caractère essentiel de ce travail, j'ai cherché à contribuer à mon échelle à cette entreprise. Pour cela j'ai d'abord rejoint en 2021 le Comité ministériel pour la Science Ouverte (CoSO), et plus particulièrement le collège Publications, qui s'intéresse précisément au méthodes techniques et juridiques permettant de lever la barrière du financement pour l'accès à la recherche et la publication des travaux et ouvrages scientifiques. En particulier, le groupe travaille à la diffusion de la stratégie de rétention des droits (*right retention strategy*, RRS) qui permet aux chercheur·se·s de conserver l'intégralité de leurs droits sur leur production, par l'application d'une licence libre (de type *Creative Commons BY*, ou autre) sur leurs ouvrages, rendant possible leur soumission dans des archives ouvertes telles que HAL, ainsi que leur réutilisation sans contrepartie (autre que l'attribution) par les membres de la communauté scientifique ou citoyenne. En plus de participer aux réflexions et travaux principaux portés par le groupe, j'ai à cette occasion eu la chance de participer à plusieurs actions spécifiques. Ainsi, j'ai été mis à contribution pour la création du passeport pour la science ouverte, et en particulier pour la réalisation de vidéos sur le sujet à destination des jeunes chercheur·se·s. Plus récemment, j'ai commencé à travailler avec la Dr. Anne-Solweig Gremillet (Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, MESRI), à la possibilité de développer et mettre en place des outils pour favoriser la communication des travaux et résultats scientifiques dans Wikipedia, afin de les rendre plus facilement accessibles par les citoyen·ne·s. Ce concept fait suite à plusieurs expérimentations menées par certains groupes et universités françaises, comme celle de Clermont-Ferrand, qui a accueilli un Wikimédien en résidence pendant un an entre 2021 et 2022.<sup>478</sup> Parmi les outils au développement desquels nous réfléchissons, un pourrait permettre aux chercheur·se·s de directement citer un ouvrage disponible dans l'archive HAL dans Wikipedia afin de permettre aux lecteur·rice·s de pouvoir avoir accès au texte intégral de la référence correspondante. Ceci serait alors accompagné par une description ou la traduction du résumé du travail considéré en français, afin d'abaisser la barrière liée à la compréhension de l'anglais par les citoyen·ne·s. Cette proposition s'appuie également sur ma participation

depuis 2021 au groupe des Ambassadeur·rice·s de HAL. Celle-ci me permet en effet d'être directement en contact avec les équipes de développement de l'archive ouverte, notamment pour la correction de bug et la remontée de problèmes soulevés par la communauté d'utilisateur·rice·s. A ce titre j'ai participé au test de la nouvelle interface, ainsi qu'au montage d'un programme de formation pour une meilleure utilisation de celle-ci. Je profite ainsi de ce contact privilégié avec les équipes de développement pour pousser la réflexion sur les différents outils que j'aimerais voir être mis en place dans HAL, notamment en association avec Wikipedia.

Plus récemment, il m'a également été proposé de rejoindre un groupe de travail européen, porté notamment par le CNRS, au sein de Knowledge Exchange, intitulé *FAIR Data and Software supporting Reproducible Research* (FDSR). Celui-ci vise à établir une série de recommandations pour les institutions de recherche nationales et européennes afin de favoriser l'adoption des principes de données FAIR (Faciles à trouver, Accessibles, Interopérables et Reproductibles/Réutilisables). Cette réflexion s'articule notamment avec mon implication dans le développement de standards ouverts comme EnzymeML pour l'encodage des données en biocatalyse, et j'y intervient comme expert pour guider les consultant·e·s chargés de produire le rapport sur les recommandations vers des proposition proches de la réalité du terrain, et des réticences actuelles auxquelles nous pouvons encore faire face.

Mon implication en science ouverte étant avant tout dirigée vers les citoyen·ne·s, j'ai aussi commencé à développer dans le cadre de mes projets de recherche, des actions de science participative. D'abord à travers l'organisation de rencontres avec les habitants de Lille et de Berlin dans le cadre du projet *PASS-BIO*, afin de leur présenter de manière vulgarisée les objectifs et résultats du projet, mais également d'échanger sur leur craintes et interrogations vis-à-vis de celui-ci. Je participe à présent au montage d'un véritable panel de citoyen·ne·s dans le cadre du projet *PLASTILOOP2.0*. Ce projet, qui est mené en association avec la Dr. Martine Legris (Centre d'Études et de Recherches Administratives, Politiques et Sociales, CERAPS), a pour but premier de former ces dernier·re·s aux questions qui régissent la production, l'utilisation et le devenir des plastiques à travers la venue d'expert·e·s académiques et industriel·le·s du domaine ayant des opinions divergentes sur la question. Une fois leur formation accomplie, il sera alors demandé aux citoyen·ne·s de formuler des propositions quant aux axes et stratégies à mettre en place dans nos futures recherches, notamment de manière très concrète concernant les problématiques scientifique à ne plus aborder, afin de mettre nos innovations en phase avec les attentes de la société. Ce travail est fortement soutenu et alimenté par la Pr. Michèle Friend (Université George Washington, Etats-Unis d'Amérique) qui profite de cette occasion pour mettre en application son nouvel outil : la boussole institutionnelle.<sup>38</sup>

Enfin, dans la mesure où le développement de ces nouveaux outils n'aurait de sens sans un travail sur le terrain, auprès de ma communauté, j'interviens désormais et surtout dans les missions du développement et de la formation en science ouverte de l'UCCS et l'UMRT BioEcoAgro. Ceci me permet de me mettre au service de mes collègues pour répondre à leur interrogations et craintes quant aux nouvelles contraintes créées par la science ouverte notamment, mais également de participer ici aussi au développement d'outils pour leur faciliter la vie, comme récemment à travers plusieurs réflexions menées en partenariat avec l'archive ouverte de l'Université de Lille, LilloA.

## Conclusion

En conclusion, ce mémoire m'a permis d'exposer mes travaux et projets dans la recherche des domaines scientifiques que j'explore, situés au croisement de l'enzymologie, de la catalyse hétérogène, des sciences des matériaux et des données. En particulier il montre comment la coopération entre toutes ces disciplines peut amener au développement de nouvelles thématiques comme la catalyse hybride et la conception de nouveaux matériaux multi-catalytiques, lesquels trouvent leur place dans la réalisation d'une chimie plus vertueuse, et plus précisément dans le cas de mon projet, pour la valorisation de composés issus de la dégradation de la biomasse. Les projets de recherche qui ont été menés jusqu'ici m'ont amené à établir de très nombreuses collaborations locales, nationales, et internationales, lesquelles alimenteront grandement mes futurs projets afin de proposer une science plurielle et de qualité. Ce mémoire se veut également pédagogue, afin d'expliquer au mieux les concepts scientifiques qu'il décrit, en particulier parce qu'il me sera prochainement demandé de les enseigner aux étudiantes et étudiants desquels j'aurai à diriger les travaux de thèse. Pour finir, j'espère avoir démontré que ma dévotion à la recherche ne s'arrête pas à la simple production de nouveaux concepts et innovations, mais qu'elle sert un dessein plus universel, en se mettant au service du bien commun et des citoyennes et citoyens, comme je crois que notre métier devrait toujours le faire.

Pour toutes ces raisons, j'espère que les membres du jury honoreront ma demande d'obtention de l'Habilitation à diriger des recherches, et m'en remets désormais à vous, membre de mon jury, pour juger de la qualité et de la pertinence de ce travail. En espérant que cette lecture vous fut plaisante.

## Bibliographie

- (1) Kelly, S. A.; Mix, S.; Moody, T. S.; Gilmore, B. F. Transaminases for Industrial Biocatalysis: Novel Enzyme Discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* **2020**, *104* (11), 4781–4794. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10585-0>.
- (2) Slabu, I.; Galman, J. L.; Lloyd, R. C.; Turner, N. J. Discovery, Engineering, and Synthetic Application of Transaminase Biocatalysts. *ACS Catal.* **2017**, *7* (12), 8263–8284. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b02686>.
- (3) Guo, F.; Berglund, P. Transaminase Biocatalysis: Optimization and Application. *Green Chem.* **2017**, *19* (2), 333–360. <https://doi.org/10.1039/C6GC02328B>.
- (4) Emilliozzi, R.; Pichat, L. Méthode simple de préparation d'acide L (+) amino-2 sulfino-3 propionique (acide cystéine sulfonique). *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1959**, 1887–1888.
- (5) Heuson, E.; Petit, J.-L.; Charmantray, F.; de Berardinis, V.; Gefflaut, T. Continuous High-Throughput Colorimetric Assays for  $\alpha$ -Transaminases. In *Protein Engineering*; Bornscheuer, U. T., Höhne, M., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2018; Vol. 1685, pp 233–245. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7366-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7366-8_13).
- (6) Heuson, E.; Petit, J.-L.; Debard, A.; Job, A.; Charmantray, F.; de Berardinis, V.; Gefflaut, T. Continuous Colorimetric Screening Assays for the Detection of Specific L- or D- $\alpha$ -Amino Acid Transaminases in Enzyme Libraries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100* (1), 397–408. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6988-0>.
- (7) Gourbeyre, L.; Heuson, E.; Charmantray, F.; Hélaïne, V.; Debard, A.; Petit, J.-L.; Berardinis, V. de; Gefflaut, T. Biocatalysed Synthesis of Chiral Amines: Continuous Colorimetric Assays for Mining Amine-Transaminases. *Catal. Sci. Technol.* **2020**. <https://doi.org/10.1039/D0CY02070B>.
- (8) Heuson, E.; Charmantray, F.; Petit, J.-L.; de Berardinis, V.; Gefflaut, T. Enantioselective Synthesis of D- and L- $\alpha$ -Amino Acids by Enzymatic Transamination Using Glutamine as Smart Amine Donor. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2019**, *361* (4), 778–785. <https://doi.org/10.1002/adsc.201801278>.
- (9) Windle, C. L.; Müller, M.; Nelson, A.; Berry, A. Engineering Aldolases as Biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* **2014**, *19* (100), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.12.010>.
- (10) Walters, M. J.; Toone, E. J. Pyruvate Aldolases in Chiral Carbon-Carbon Bond Formation. *Nat Protoc* **2007**, *2* (7), 1825–1830. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.260>.
- (11) Guérard-Hélaïne, C.; Heuson, E.; Ndiaye, M.; Gourbeyre, L.; Lemaire, M.; Hélaïne, V.; Charmantray, F.; Petit, J.-L.; Salanoubat, M.; Berardinis, V. de; Gefflaut, T. Stereoselective Synthesis of  $\gamma$ -Hydroxy- $\alpha$ -Amino Acids through Aldolase–Transaminase Recycling Cascades. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (39), 5465–5468. <https://doi.org/10.1039/C7CC00742F>.
- (12) Lorillière, M.; Sousa, M. D.; Bruna, F.; Heuson, E.; Gefflaut, T.; Berardinis, V. de; Saravanan, T.; Yi, D.; Fessner, W.-D.; Charmantray, F.; Hecquet, L. One-Pot, Two-Step Cascade Synthesis of Naturally Rare L-Erythro (3S,4S) Ketoses by Coupling a Thermostable Transaminase and Transketolase. *Green Chem.* **2017**, *19* (2), 425–435. <https://doi.org/10.1039/C6GC02015A>.
- (13) Monteiro, M. R.; Kugelmeier, C. L.; Pinheiro, R. S.; Batalha, M. O.; Da Silva César, A. Glycerol from Biodiesel Production: Technological Paths for Sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2018**, *88*, 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.019>.
- (14) Katryniok, B.; Kimura, H.; Skrzyńska, E.; Girardon, J.-S.; Fongarland, P.; Capron, M.; Ducoulombier, R.; Mimura, N.; Paul, S.; Dumeignil, F. Selective Catalytic Oxidation of Glycerol: Perspectives for High Value Chemicals. *Green Chem.* **2011**, *13* (8), 1960–1979. <https://doi.org/10.1039/C1GC15320J>.
- (15) Skrzyńska, E.; El Roz, A.; Paul, S.; Capron, M.; Dumeignil, F. Glycerol Partial Oxidation over Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Catalysts under Basic and Base-Free Conditions—Effect of the Particle Size. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2019**, *96* (1), 63–74. <https://doi.org/10.1002/aocs.12159>.
- (16) Díaz, J. A.; Skrzyńska, E.; Girardon, J.-S.; Ftouni, J.; Capron, M.; Dumeignil, F.; Fongarland, P. Kinetic Modeling of the Quasi-Homogeneous Oxidation of Glycerol over Unsupported Gold Particles in the Liquid Phase. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2016**, *118* (1), 72–79. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500189>.
- (17) Skrzyńska, E.; Zaid, S.; Addad, A.; Girardon, J.-S.; Capron, M.; Dumeignil, F. Performance of Ag/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Catalysts in the Liquid Phase Oxidation of Glycerol – Effect of Preparation Method and Reaction Conditions. *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6* (9), 3182–3196. <https://doi.org/10.1039/C5CY01581B>.
- (18) Herrmann, A. Controlled Release of Volatiles under Mild Reaction Conditions: From Nature to Everyday Products. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (31), 5836–5863. <https://doi.org/10.1002/anie.200700264>.
- (19) Janssen, L. M. G.; van Oosten, R.; Paul, C. E.; Arends, I. W. C. E.; Hollmann, F. Lipase-Catalyzed Transesterification of Ethyl Formate to Octyl Formate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, *105*, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.03.016>.
- (20) Ferroni, F. M.; Tolmie, C.; Smit, M. S.; Opperman, D. J. Alkyl Formate Ester Synthesis by a Fungal Baeyer–Villiger Monooxygenase. *ChemBioChem* **2017**, *18* (6), 515–517. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600684>.
- (21) Gershenzon, J.; Dudareva, N. The Function of Terpene Natural Products in the Natural World. *Nat Chem Biol* **2007**, *3* (7), 408–414. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>.
- (22) Bischoff, T. A.; Kelley, C. J.; Karchesy, Y.; Laurantos, M.; Nguyen-Dinh, P.; Arefi, A. G. Antimalarial Activity of Lactucin and Lactucopicrin: Sesquiterpene Lactones Isolated from Cichorium Intybus L. *J Ethnopharmacol* **2004**, *95* (2–3), 455–457. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.031>.
- (23) Häkkinen, S. T.; Soković, M.; Nohynek, L.; Ćirić, A.; Ivanov, M.; Stojković, D.; Tsitko, I.; Matos, M.; Baixinho, J. P.;

- Ivasiv, V.; Fernández, N.; Nunes Dos Santos, C.; Oksman-Caldentey, K.-M. Chicory Extracts and Sesquiterpene Lactones Show Potent Activity against Bacterial and Fungal Pathogens. *Pharmaceuticals (Basel)* **2021**, *14* (9), 941. <https://doi.org/10.3390/ph14090941>.
- (24) Moujir, L.; Callies, O.; Sousa, P. M. C.; Sharopov, F.; Seca, A. M. L. Applications of Sesquiterpene Lactones: A Review of Some Potential Success Cases. *Applied Sciences* **2020**, *10* (9), 3001. <https://doi.org/10.3390/app10093001>.
- (25) Shoaib, M.; Shah, I.; Ali, N.; Adhikari, A.; Tahir, M. N.; Shah, S. W. A.; Ishtiaq, S.; Khan, J.; Khan, S.; Umer, M. N. Sesquiterpene Lactone! A Promising Antioxidant, Anticancer and Moderate Antinociceptive Agent from *Artemisia Macrocephala* Jacquem. *BMC Complement Altern Med* **2017**, *17* (1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1517-y>.
- (26) Loutrari, H.; HatziaPOSTOLOU, M.; Skouridou, V.; Papadimitriou, E.; Roussos, C.; Kolisis, F. N.; Papapetropoulos, A. Perillyl Alcohol Is an Angiogenesis Inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* **2004**, *311* (2), 568–575. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.070516>.
- (27) Chen, T. C.; da Fonseca, C. O.; Levin, D.; Schönthal, A. H. The Monoterpenoid Perillyl Alcohol: Anticancer Agent and Medium to Overcome Biological Barriers. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (12), 2167. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122167>.
- (28) Faria, G. M.; Soares, I. D. P.; D'Alincourt Salazar, M.; Amorim, M. R.; Pessoa, B. L.; da Fonseca, C. O.; Quirico-Santos, T. Intranasal Perillyl Alcohol Therapy Improves Survival of Patients with Recurrent Glioblastoma Harboring Mutant Variant for MTHFR Rs1801133 Polymorphism. *BMC Cancer* **2020**, *20* (1), 294. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-06802-8>.
- (29) Chen, T. A Perillyl Alcohol-3 Bromopyruvate Conjugate and Methods of Treating Cancer. WO2018102412A1, June 7, 2018. <https://patents.google.com/patent/WO2018102412A1/en> (accessed 2023-07-20).
- (30) Chen, T.; Levin, D.; Pupalli, S. Pharmaceutical Compositions Comprising Perillyl Alcohol Derivatives. US9522918B2, December 20, 2016. <https://patents.google.com/patent/US9522918B2/en> (accessed 2023-07-20).
- (31) Xanthakis, E.; Theodosiou, E.; Magkouta, S.; Stamatis, H.; Loutrari, H.; Roussos, C.; Kolisis, F. Enzymatic transformation of flavonoids and terpenoids: Structural and functional diversity of the novel derivatives. *Pure and Applied Chemistry* **2010**, *82* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-09-01-19>.
- (32) Xanthakis, E.; Magkouta, S.; Loutrari, H.; Stamatis, H.; Roussos, C.; Kolisis, F. N. Enzymatic Synthesis of Perillyl Alcohol Derivatives and Investigation of Their Antiproliferative Activity. *Biocatalysis and Biotransformation* **2009**, *27* (3), 170–178. <https://doi.org/10.1080/10242420902811089>.
- (33) Mosheim, J. R.; Ruggieri, F.; Humeau, C.; Hance, P.; Willand, N.; Hilbert, J.-L.; Heuson, E.; Froidevaux, R. Biocatalytic Approach to the Chemoselective Acylation of Sesquiterpene Lactones from Chicory: A Pathway to Novel Ester Derivatives. ChemRxiv June 22, 2023. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-3c05k-v2>.
- (34) Directive (EU) 2018/2001 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on the Promotion of the Use of Energy from Renewable Sources (Text with EEA Relevance.); 2018; Vol. OJ L. <http://data.europa.eu/eli/dir/2018/2001/oj/eng> (accessed 2020-07-15).
- (35) *White Biotechnology*; Ulber, R., Sell, D., Eds.; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2007; Vol. 105. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-45696-4>.
- (36) Dence, C. W. The Determination of Lignin. In *Methods in Lignin Chemistry*; Lin, S. Y., Dence, C. W., Eds.; Springer Series in Wood Science; Springer: Berlin, Heidelberg, 1992; pp 33–61. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7_3).
- (37) Thoresen, P. P.; Matsakas, L.; Rova, U.; Christakopoulos, P. Recent Advances in Organosolv Fractionation: Towards Biomass Fractionation Technology of the Future. *Bioresour Technol* **2020**, *306*, 123189. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123189>.
- (38) Araque-Marin, M.; Bellot Noronha, F.; Capron, M.; Dumeignil, F.; Friend, M.; Heuson, E.; Itabaiana, I.; Jalowiecki-Duhamel, L.; Katryniok, B.; Löfberg, A.; Paul, S.; Wojcieszak, R. Strengthening the Connection between Science, Society and Environment to Develop Future French and European Bioeconomies: Cutting-Edge Research of VAALBIO Team at UCCS. *Molecules* **2022**, *27* (12), 3889. <https://doi.org/10.3390/molecules27123889>.
- (39) Bi, Z.; Lai, B.; Zhao, Y.; Yan, L. Fast Disassembly of Lignocellulosic Biomass to Lignin and Sugars by Molten Salt Hydrate at Low Temperature for Overall Biorefinery. *ACS Omega* **2018**, *3* (3), 2984–2993. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00057>.
- (40) Kabir, G.; Hameed, B. H. Recent Progress on Catalytic Pyrolysis of Lignocellulosic Biomass to High-Grade Bio-Oil and Bio-Chemicals. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2017**, *70*, 945–967. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.001>.
- (41) Sun, Z.; Barta, K. Cleave and Couple: Toward Fully Sustainable Catalytic Conversion of Lignocellulose to Value Added Building Blocks and Fuels. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (56), 7725–7745. <https://doi.org/10.1039/C8CC02937G>.
- (42) Schutyser, W.; Renders, T.; Van Den Bosch, S.; Koelewijn, S.-F.; Beckham, G. T.; Sels, B. F. Chemicals from Lignin: An Interplay of Lignocellulose Fractionation, Depolymerisation, and Upgrading. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (3), 852–908. <https://doi.org/10.1039/C7CS00566K>.
- (43) Van den Bosch, S.; Koelewijn, S.-F.; Renders, T.; Van den Bossche, G.; Vangeel, T.; Schutyser, W.; Sels, B. F. Catalytic Strategies Towards Lignin-Derived Chemicals. *Top Curr Chem (Z)* **2018**, *376* (5), 36. <https://doi.org/10.1007/s41061-018-0214-3>.
- (44) Bomble, Y. J.; Lin, C.-Y.; Amore, A.; Wei, H.; Holwerda, E. K.; Ciesielski, P. N.; Donohoe, B. S.; Decker, S. R.; Lynd, L. R.; Himmel, M. E. Lignocellulose Deconstruction in the Biosphere. *Current Opinion in Chemical Biology* **2017**, *41*, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.013>.
- (45) Sethupathy, S.; Morales, G. M.; Li, Y.; Wang, Y.; Jiang, J.; Sun, J.; Zhu, D. Harnessing Microbial Wealth for Lignocellulose Biomass Valorization through Secretomics: A Review. *Biotechnol. Biofuels* **2021**, *14* (1), 154.



<https://doi.org/10.1186/s13068-021-02006-9>.

- (46) Ajeje, S. B.; Hu, Y.; Song, G.; Peter, S. B.; Afful, R. G.; Sun, F.; Asadollahi, M. A.; Amiri, H.; Abdulkhani, A.; Sun, H. Thermostable Cellulases/Xylanases From Thermophilic and Hyperthermophilic Microorganisms: Current Perspective. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 794304. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794304>.
- (47) Houfani, A. A.; Anders, N.; Spiess, A. C.; Baldrian, P.; Benallaoua, S. Insights from Enzymatic Degradation of Cellulose and Hemicellulose to Fermentable Sugars- a Review. *Biomass Bioenerg.* **2020**, *134*, 105481. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105481>.
- (48) Chylenski, P.; Forsberg, Z.; Ståhlberg, J.; Várnai, A.; Lersch, M.; Bengtsson, O.; Sæbø, S.; Horn, S. J.; Eijssink, V. G. H. Development of Minimal Enzyme Cocktails for Hydrolysis of Sulfite-Pulped Lignocellulosic Biomass. *Journal of Biotechnology* **2017**, *246*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.02.009>.
- (49) Carapito, R.; Carapito, C.; Jeltsch, J.-M.; Phalip, V. Efficient Hydrolysis of Hemicellulose by a *Fusarium Graminearum* Xylanase Blend Produced at High Levels in *Escherichia Coli*. *Bioresource Technology* **2009**, *100* (2), 845–850. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.006>.
- (50) Meyer, A. S.; Rosgaard, L.; Sørensen, H. R. The Minimal Enzyme Cocktail Concept for Biomass Processing. *Journal of Cereal Science* **2009**, *50* (3), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.01.010>.
- (51) Banerjee, G.; Scott-Craig, J. S.; Walton, J. D. Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective. *Bioenerg. Res.* **2010**, *3* (1), 82–92. <https://doi.org/10.1007/s12155-009-9067-5>.
- (52) Champreda, V.; Mhuantong, W.; Lekakarn, H.; Bunternsook, B.; Kanokratana, P.; Zhao, X.-Q.; Zhang, F.; Inoue, H.; Fujii, T.; Eurwilaichitr, L. Designing Cellulolytic Enzyme Systems for Biorefinery: From Nature to Application. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2019**, *128* (6), 637–654. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.05.007>.
- (53) Couturier, M.; Ladevèze, S.; Sulzenbacher, G.; Ciano, L.; Fanuel, M.; Moreau, C.; Villares, A.; Cathala, B.; Chaspoul, F.; Frandsen, K. E.; Labourel, A.; Herpoël-Gimbert, I.; Grisel, S.; Haon, M.; Lenfant, N.; Rogniaux, H.; Ropartz, D.; Davies, G. J.; Rosso, M.-N.; Walton, P. H.; Henrissat, B.; Berrin, J.-G. Lytic Xylan Oxidases from Wood-Decay Fungi Unlock Biomass Degradation. *Nature Chemical Biology* **2018**, *14* (3), 306–310. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2558>.
- (54) Berrin, J.-G.; Navarro, D.; Couturier, M.; Olivé, C.; Grisel, S.; Haon, M.; Taussac, S.; Lechat, C.; Courtecuisse, R.; Favel, A.; Coutinho, P. M.; Lesage-Meessen, L. Exploring the Natural Fungal Biodiversity of Tropical and Temperate Forests toward Improvement of Biomass Conversion. *Appl Environ Microbiol* **2012**, *78* (18), 6483–6490. <https://doi.org/10.1128/AEM.01651-12>.
- (55) Couturier, M.; Navarro, D.; Olivé, C.; Chevret, D.; Haon, M.; Favel, A.; Lesage-Meessen, L.; Henrissat, B.; Coutinho, P. M.; Berrin, J.-G. Post-Genomic Analyses of Fungal Lignocellulosic Biomass Degradation Reveal the Unexpected Potential of the Plant Pathogen *Ustilago Maydis*. *BMC Genomics* **2012**, *13* (1), 57. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-57>.
- (56) Debeire, P.; Delalande, F.; Habrylo, O.; Jeltsch, J.-M.; Van Dorsselaer, A.; Phalip, V. Enzymatic Cocktails Produced by *Fusarium Graminearum* under Submerged Fermentation Using Different Lignocellulosic Biomasses. *FEMS Microbiol Lett* **2014**, *355* (2), 116–123. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12467>.
- (57) Schückel, J.; Kračun, S. K.; Willats, W. G. T. High-Throughput Screening of Carbohydrate-Degrading Enzymes Using Novel Insoluble Chromogenic Substrate Assay Kits. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* **2016**, No. 115, e54286. <https://doi.org/10.3791/54286>.
- (58) Kračun, S. K.; Schückel, J.; Westereng, B.; Thygesen, L. G.; Monrad, R. N.; Eijssink, V. G. H.; Willats, W. G. T. A New Generation of Versatile Chromogenic Substrates for High-Throughput Analysis of Biomass-Degrading Enzymes. *Biotechnology for Biofuels* **2015**, *8*, 70. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0250-y>.
- (59) Raulo, R.; Heuson, E.; Siah, A.; Phalip, V.; Froidevaux, R. Innovative Microscale Workflow from Fungi Cultures to Cell Wall-Degrading Enzyme Screening. *Microbial Biotechnology* **2019**, *12* (6), 1286–1292. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13405>.
- (60) Raulo, R.; Heuson, E.; Froidevaux, R.; Phalip, V. Combining Analytical Approaches for Better Lignocellulosic Biomass Degradation: A Way of Improving Fungal Enzymatic Cocktails? *Biotechnol Lett* **2021**, *43*, 2283–2298. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03201-2>.
- (61) Pang, L.; Barras, A.; Mishyn, V.; Heyte, S.; Heuson, E.; Oubaha, H.; Sandu, G.; Melinte, S.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. Plasmon-Driven Electrochemical Methanol Oxidation on Gold Nanohole Electrodes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, acsami.0c14436. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c14436>.
- (62) Meuwly, M. Machine Learning for Chemical Reactions. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (16), 10218–10239. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00033>.
- (63) Schlexer Lamoureux, P.; Winther, K. T.; Garrido Torres, J. A.; Streibel, V.; Zhao, M.; Bajdich, M.; Abild-Pedersen, F.; Bligaard, T. Machine Learning for Computational Heterogeneous Catalysis. *ChemCatChem* **2019**, *11* (16), 3581–3601. <https://doi.org/10.1002/cctc.201900595>.
- (64) *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*; Lugtenberg, B., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3>.
- (65) O'Brien, P. A. Biological Control of Plant Diseases. *Australasian Plant Pathol.* **2017**, *46* (4), 293–304. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>.
- (66) Tschamtkte, T.; Clough, Y.; Wanger, T. C.; Jackson, L.; Motzke, I.; Perfecto, I.; Vandermeer, J.; Whitbread, A. Global Food Security, Biodiversity Conservation and the Future of Agricultural Intensification. *Biological Conservation* **2012**, *151* (1), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.01.068>.
- (67) Placinta, C. M.; D'Mello, J. P. F.; Macdonald, A. M. C. A Review of Worldwide Contamination of Cereal Grains and

- Animal Feed with Fusarium Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* **1999**, *78* (1), 21–37. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00278-8).
- (68) Dweba, C. C.; Figlan, S.; Shimelis, H. A.; Motaung, T. E.; Sydenham, S.; Mwadzingeni, L.; Tsilo, T. J. Fusarium Head Blight of Wheat: Pathogenesis and Control Strategies. *Crop Protection* **2017**, *91*, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.002>.
- (69) Olivain, C.; Trouvelot, S.; Binet, M.-N.; Cordier, C.; Pugin, A.; Alabouvette, C. Colonization of Flax Roots and Early Physiological Responses of Flax Cells Inoculated with Pathogenic and Nonpathogenic Strains of Fusarium Oxysporum. *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69* (9), 5453–5462. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5453-5462.2003>.
- (70) Everts, K. L.; Himmelstein, J. C. Fusarium Wilt of Watermelon: Towards Sustainable Management of a Re-Emerging Plant Disease. *Crop Protection* **2015**, *73*, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.019>.
- (71) Ploetz, R. C. Fusarium Wilt of Banana Is Caused by Several Pathogens Referred to as Fusarium Oxysporum f. Sp. Cubense. *Phytopathology* **2006**, *96* (6), 653–656. <https://doi.org/10.1094/PHTO-96-0653>.
- (72) Mejri, S.; Siah, A.; Coutte, F.; Magnin-Robert, M.; Randoux, B.; Tisserant, B.; Krier, F.; Jacques, P.; Reignault, P.; Halama, P. Biocontrol of the Wheat Pathogen Zymoseptoria Tritici Using Cyclic Lipopeptides from Bacillus Subtilis. *Environ Sci Pollut Res* **2018**, *25* (30), 29822–29833. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9241-9>.
- (73) Fiore, A.; Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Salzano, A. M.; Scaloni, A.; Grgurina, I.; Fullone, M. R.; Gallo, M.; Swasey, C.; Fogliano, V.; Takemoto, J. Y. Bioactive Lipopeptides of Ice-Nucleating Snow Bacterium Pseudomonas Syringae Strain 31R1. *FEMS Microbiol Lett* **2008**, *286* (2), 158–165. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01247.x>.
- (74) Hobbs, G.; Frazer, C. M.; Gardner, D. C. J.; Flett, F.; Oliver, S. G. Pigmented Antibiotic Production by Streptomyces Coelicolor A3(2): Kinetics and the Influence of Nutrients. *Microbiology* **1990**, *136* (11), 2291–2296. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-11-2291>.
- (75) Benítez, T.; Rincón, A. M.; Limón, M. C.; Codón, A. C. Biocontrol Mechanisms of Trichoderma Strains. *Int Microbiol* **2004**, *7* (4), 249–260.
- (76) Omura, S.; Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Takahashi, C.; Shinose, M.; Takahashi, Y.; Horikawa, H.; Nakazawa, H.; Osonoe, T.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M. Genome Sequence of an Industrial Microorganism Streptomyces Avermitilis: Deducing the Ability of Producing Secondary Metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (21), 12215–12220. <https://doi.org/10.1073/pnas.211433198>.
- (77) Vinale, F.; Nicoletti, R.; Borrelli, F.; Mangoni, A.; Parisi, O. A.; Marra, R.; Lombardi, N.; Lacatena, F.; Grauso, L.; Finizio, S.; Lorito, M.; Woo, S. L. Co-Culture of Plant Beneficial Microbes as Source of Bioactive Metabolites. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 14330. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14569-5>.
- (78) Jarmusch, S. A.; Lagos-Susaeta, D.; Diab, E.; Salazar, O.; Asenjo, J. A.; Ebel, R.; Jaspars, M. Iron-Meditated Fungal Starvation by Lupine Rhizosphere-Associated and Extremotolerant Streptomyces Sp. S29 Desferrioxamine Production. *Mol Omics* **2021**, *17* (1), 95–107. <https://doi.org/10.1039/D0MO00084A>.
- (79) Aoyagi, T.; Hatsu, M.; Kojima, F.; Hayashi, C.; Hamada, M.; Takeuchi, T. Benarthin: A New Inhibitor of Pyroglutamyl Peptidase. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiot.* **1992**, *45* (7), 1079–1083. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.1079>.
- (80) Mishra, S.; Lin, Z.; Pang, S.; Zhang, Y.; Bhatt, P.; Chen, S. Biosurfactant Is a Powerful Tool for the Bioremediation of Heavy Metals from Contaminated Soils. *Journal of Hazardous Materials* **2021**, *418*, 126253. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126253>.
- (81) Pacwa-Płociniczak, M.; Płaza, G. A.; Piotrowska-Seget, Z.; Cameotra, S. S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Int J Mol Sci* **2011**, *12* (1), 633–654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>.
- (82) Zhao, P.; Xue, Y.; Li, X.; Li, J.; Zhao, Z.; Quan, C.; Gao, W.; Zu, X.; Bai, X.; Feng, S. Fungi-Derived Lipopeptide Antibiotics Developed since 2000. *Peptides* **2019**, *113*, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.02.002>.
- (83) Oliveras, À.; Baró, A.; Montesinos, L.; Badosa, E.; Montesinos, E.; Feliu, L.; Planas, M. Antimicrobial Activity of Linear Lipopeptides Derived from BP100 towards Plant Pathogens. *PLoS One* **2018**, *13* (7), e0201571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201571>.
- (84) Rai, M.; Pandit, R.; Gaikwad, S.; Kövics, G. Antimicrobial Peptides as Natural Bio-Preservative to Enhance the Shelf-Life of Food. *J Food Sci Technol* **2016**, *53* (9), 3381–3394. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2318-5>.
- (85) Liu, X.; Ren, B.; Gao, H.; Liu, M.; Dai, H.; Song, F.; Yu, Z.; Wang, S.; Hu, J.; Kokare, C. R.; Zhang, L. Optimization for the Production of Surfactin with a New Synergistic Antifungal Activity. *PLoS ONE* **2012**, *7* (5), e34430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034430>.
- (86) Wei-Chuan Chen; Ruey-Shin Juang; Yu-Hong Wei. Applications of a Lipopeptide Biosurfactant, Surfactin, Produced by Microorganisms. *Biochemical engineering journal* **2015**, *103*, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>.
- (87) Sen, R. Surfactin: Biosynthesis, Genetics and Potential Applications. In *Biosurfactants*; Sen, R., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer: New York, NY, 2010; pp 316–323. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_24).
- (88) Shaligram, N. S.; Singhal, R. S. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. **2010**, 16.
- (89) Etchegaray, A.; Coutte, F.; Chataigné, G.; Béchet, M.; Dos Santos, R. H. Z.; Leclère, V.; Jacques, P. Production of Bacillus Amyloliquefaciens OG and Its Metabolites in Renewable Media: Valorisation for Biodiesel Production and p-Xylene Decontamination. *Can J Microbiol* **2017**, *63* (1), 46–60. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0288>.
- (90) Yang, H.; Yu, H.; Shen, Z. A Novel High-Throughput and Quantitative Method Based on Visible Color Shifts for

- Screening *Bacillus Subtilis* THY-15 for Surfactin Production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2015**, *42* (8), 1139–1147. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1635-4>.
- (91) Heuson, E.; Etchegaray, A.; Filipe, S. L.; Beretta, D.; Chevalier, M.; Phalip, V.; Coutte, F. Screening of Lipopeptide-Producing Strains of *Bacillus* Sp. Using a New Automated and Sensitive Fluorescence Detection Method. *Biotechnology Journal* **2019**, *14* (4), 1800314. <https://doi.org/10.1002/biot.201800314>.
- (92) Munakata, Y.; Heuson, E.; Daboudet, T.; Deracinois, B.; Duban, M.; Hehn, A.; Coutte, F.; Slezack-Deschaumes, S. Screening of Antimicrobial Activities and Lipopeptide Production of Endophytic Bacteria Isolated from Vetiver Roots. *Microorganisms* **2022**, *10* (2), 209. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020209>.
- (93) Martinez, M. V.; Whitaker, J. R. The Biochemistry and Control of Enzymatic Browning. *Trends in Food Science & Technology* **1995**, *6* (6), 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89054-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89054-8).
- (94) Gonçalves, A. A.; De Oliveira, A. R. M. Melanosis in Crustaceans: A Review. *LWT - Food Science and Technology* **2016**, *65*, 791–799. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.011>.
- (95) Zeyer, E.; Heuson, E.; Himber, C.; Phalip, V.; Le Bris, C.; Dhulster, P.; Brisabois, A.; Flahaut, C.; Cudennec, B.; Grard, T.; Duflos, G. Novel Approach to Identify Phenoloxidases Inhibitors: Optimization of Spectrophotometric MBTH Assay for High Throughput Use Enzymatic Assays and Analysis. *Food Control* **2018**, *93*, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.043>.
- (96) Delannoy, C. P.; Heuson, E.; Herledan, A.; Oger, F.; Thiroux, B.; Chevalier, M.; Gromada, X.; Rolland, L.; Froguel, P.; Deprez, B.; Paul, S.; Annicotte, J.-S. High-Throughput Quantitative Screening of Glucose-Stimulated Insulin Secretion and Insulin Content Using Automated MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Cells* **2023**, *12* (6), 849. <https://doi.org/10.3390/cells12060849>.
- (97) Anastas, P.; Warner, J. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: Oxford, New York, 2000.
- (98) Santos, E. H.; Carvalho, C.; Terzi, C. M.; Nakagaki, S. Recent Advances in Catalyzed Sequential Reactions and the Potential Use of Tetrapyrrolic Macrocycles as Catalysts. *Molecules* **2018**, *23* (11), 2796. <https://doi.org/10.3390/molecules23112796>.
- (99) Schmidt, S.; Castiglione, K.; Kourist, R. Overcoming the Incompatibility Challenge in Chemoenzymatic and Multi-Catalytic Cascade Reactions. *Chemistry - A European Journal* **2018**, *24* (8), 1755–1768. <https://doi.org/10.1002/chem.201703353>.
- (100) Gandomkar, S.; Źądło-Dobrowolska, A.; Kroutil, W. Extending Designed Linear Biocatalytic Cascades for Organic Synthesis. *ChemCatChem* **2019**, *11* (1), 225–243. <https://doi.org/10.1002/cctc.201801063>.
- (101) Sperl, J. M.; Sieber, V. Multienzyme Cascade Reactions—Status and Recent Advances. *ACS Catal.* **2018**, *8* (3), 2385–2396. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b03440>.
- (102) Gimbernat, A.; Guehl, M.; Lopes Ferreira, N.; Heuson, E.; Dhulster, P.; Capron, M.; Dumeignil, F.; Delcroix, D.; Girardon, J.-S.; Froidevaux, R.; Gimbernat, A.; Guehl, M.; Lopes Ferreira, N.; Heuson, E.; Dhulster, P.; Capron, M.; Dumeignil, F.; Delcroix, D.; Girardon, J.-S.; Froidevaux, R. From a Sequential Chemo-Enzymatic Approach to a Continuous Process for HMF Production from Glucose. *Catalysts* **2018**, *8* (8), 335. <https://doi.org/10.3390/catal8080335>.
- (103) Li, X.; Cao, X.; Xiong, J.; Ge, J. Enzyme-Metal Hybrid Catalysts for Chemoenzymatic Reactions. *Small* **2019**, *19* (27), 1902751. <https://doi.org/10.1002/sml.201902751>.
- (104) Litman, Z. C.; Wang, Y.; Zhao, H.; Hartwig, J. F. Cooperative Asymmetric Reactions Combining Photocatalysis and Enzymatic Catalysis. *Nature* **2018**, *560* (7718), 355–359. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0413-7>.
- (105) Jagadeesan, D. Multifunctional Nanocatalysts for Tandem Reactions: A Leap toward Sustainability. *Appl. Catal., A* **2016**, *511*, 59–77. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2015.11.033>.
- (106) Galván, A.; Fañanás, F. J.; Rodríguez, F. Multicomponent and Multicatalytic Reactions - A Synthetic Strategy Inspired by Nature. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, *2016* (9), 1306–1313. <https://doi.org/10.1002/ejic.201501287>.
- (107) Simon, R. C.; Richter, N.; Busto, E.; Kroutil, W. Recent Developments of Cascade Reactions Involving  $\omega$ -Transaminases. *ACS Catalysis* **2014**, *4* (1), 129–143. <https://doi.org/10.1021/cs400930v>.
- (108) Pellissier, H. Recent Developments in Enantioselective Multicatalysed Tandem Reactions. *Tetrahedron* **2013**, *69* (35), 7171–7210. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.06.020>.
- (109) Pellissier, H. Recent Developments in Asymmetric Organocatalytic Domino Reactions. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354* (2–3), 237–294. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100714>.
- (110) Wasilke, J.-C.; Obrey, S. J.; Baker, R. T.; Bazan, G. C. Concurrent Tandem Catalysis. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (3), 1001–1020. <https://doi.org/10.1021/cr020018n>.
- (111) Fogg, D. E.; dos Santos, E. N. Tandem Catalysis: A Taxonomy and Illustrative Review. *Coordination Chemistry Reviews* **2004**, *248* (21–24), 2365–2379. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.05.012>.
- (112) Biemolt, J.; Ruijter, E. Advances in Palladium-Catalyzed Cascade Cyclizations. *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360* (20), 3821–3871. <https://doi.org/10.1002/adsc.201800526>.
- (113) Reyes, E.; Uria, U.; Carrillo, L.; Vicario, J. Enantioselective Cascade Reactions under N-Heterocyclic Carbene Catalysis. *Synthesis* **2016**, *49* (03), 451–471. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1589470>.
- (114) Alba, A.-N.; Companyo, X.; Viciano, M.; Rios, R. Organocatalytic Domino Reactions. *COC* **2009**, *13* (14), 1432–1474. <https://doi.org/10.2174/138527209789055054>.
- (115) Tietze, L. F. Domino Reactions in Organic Synthesis. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (1), 115–136. <https://doi.org/10.1021/cr950027e>.
- (116) Arya, A.; Kumar, A. Inconsistencies in Some Common Terms and Notations in Enzymology: Textbook Examples and

- Suggestions: Inconsistencies in Some Common Terms and Notations in Enzymology. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **2019**, *47* (2), 140–144. <https://doi.org/10.1002/bmb.21204>.
- (117) Friedman, A. A.; Panteleev, J.; Tsoung, J.; Huynh, V.; Lautens, M. Rh/Pd Catalysis with Chiral and Achiral Ligands: Domino Synthesis of Aza-Dihydrodibenzoxepines. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (37), 9755–9758. <https://doi.org/10.1002/anie.201303659>.
- (118) Mukherjee, S.; List, B. Chiral Counteranions in Asymmetric Transition-Metal Catalysis: Highly Enantioselective Pd/Bronsted Acid-Catalyzed Direct  $\alpha$ -Allylation of Aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (37), 11336–11337. <https://doi.org/10.1021/ja074678r>.
- (119) Murahashi, S.; Makabe, Y.; Kunita, K. Palladium(0)-Catalyzed Rearrangement of N-Allyl Enamines. Synthesis of  $\Delta^2$ ,  $\Delta^3$ -Unsaturated Imines and  $\Delta^2$ ,  $\Delta^3$ -Unsaturated Carbonyl Compounds. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (19), 4489–4495. <https://doi.org/10.1021/jo00254a013>.
- (120) Köhler, V.; Wilson, Y. M.; Dürrenberger, M.; Ghislieri, D.; Churakova, E.; Quinto, T.; Knörr, L.; Häussinger, D.; Hollmann, F.; Turner, N. J.; Ward, T. R. Synthetic Cascades Are Enabled by Combining Biocatalysts with Artificial Metalloenzymes. *Nature Chemistry* **2013**, *5* (2), 93–99. <https://doi.org/10.1038/nchem.1498>.
- (121) Ghislieri, D.; Green, A. P.; Pontini, M.; Willies, S. C.; Rowles, I.; Frank, A.; Grogan, G.; Turner, N. J. Engineering an Enantioselective Amine Oxidase for the Synthesis of Pharmaceutical Building Blocks and Alkaloid Natural Products. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (29), 10863–10869. <https://doi.org/10.1021/ja4051235>.
- (122) Steinreiber, J.; Faber, K.; Griengl, H. De-Racemization of Enantiomers versus De-Epimerization of Diastereomers—Classification of Dynamic Kinetic Asymmetric Transformations (DYKAT). *Chemistry - A European Journal* **2008**, *14* (27), 8060–8072. <https://doi.org/10.1002/chem.200701643>.
- (123) Moberg, C. Minor Enantiomer Recycling – a Strategy to Improve Enantioselectivity. *Pure and Applied Chemistry* **2016**, *88* (4), 309–316. <https://doi.org/10.1515/pac-2015-1205>.
- (124) Wingstrand, E.; Laurell, A.; Fransson, L.; Hult, K.; Moberg, C. Minor Enantiomer Recycling: Metal Catalyst, Organocatalyst and Biocatalyst Working in Concert. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15* (44), 12107–12113. <https://doi.org/10.1002/chem.200901338>.
- (125) Sattler, J. H.; Fuchs, M.; Tauber, K.; Mutti, F. G.; Faber, K.; Pfeffer, J.; Haas, T.; Kroutil, W. Redox Self-Sufficient Biocatalyst Network for the Amination of Primary Alcohols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (36), 9156–9159. <https://doi.org/10.1002/anie.201204683>.
- (126) Liang, Q.-J.; Xu, Y.-H.; Loh, T.-P. Multi-Catalyst Promoted Asymmetric Relay Reactions. *Org. Chem. Front.* **2018**, *5* (18), 2765–2768. <https://doi.org/10.1039/c8qo00604k>.
- (127) Shugrue, C. R.; Sculimbrene, B. R.; Jarvo, E. R.; Mercado, B. Q.; Miller, S. J. Outer-Sphere Control for Divergent Multicatalysis with Common Catalytic Moieties. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (3), 1664–1672. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b03068>.
- (128) Walsh, C. T.; Moore, B. S. Enzymatic Cascade Reactions in Biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (21), 6846–6879. <https://doi.org/10.1002/anie.201807844>.
- (129) Rudroff, F. Whole-Cell Based Synthetic Enzyme Cascades—Light and Shadow of a Promising Technology. *Current Opinion in Chemical Biology* **2019**, *49*, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.016>.
- (130) Claaßen, C.; Gerlach, T.; Rother, D. Stimulus-Responsive Regulation of Enzyme Activity for One-Step and Multi-Step Syntheses. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2019**, *361* (11), 2387–2401. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900169>.
- (131) Petroll, K.; Kopp, D.; Care, A.; Bergquist, P. L.; Sunna, A. Tools and Strategies for Constructing Cell-Free Enzyme Pathways. *Biotechnology Advances* **2019**, *37* (1), 91–108. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.007>.
- (132) Aalbers, F. S.; Fraaije, M. W. Enzyme Fusions in Biocatalysis: Coupling Reactions by Pairing Enzymes. *ChemBioChem* **2019**, *20* (1), 20–28. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800394>.
- (133) Womble, C. T.; Kuepfert, M.; Cohen, A. E.; Weck, M. Multicompartment Polymeric Nanoreactors for Non-Orthogonal Cascade Catalysis. *Macromol. Rapid Commun.* **2019**, *40* (1), 1800580. <https://doi.org/10.1002/marc.201800580>.
- (134) Climent, M. J.; Corma, A.; Iborra, S.; Sabater, M. J. Heterogeneous Catalysis for Tandem Reactions. *ACS Catal.* **2014**, *4* (3), 870–891. <https://doi.org/10.1021/cs401052k>.
- (135) Robert, C.; Thomas, C. M. Tandem Catalysis: A New Approach to Polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (24), 9392–9402. <https://doi.org/10.1039/C3CS60287G>.
- (136) Díaz, U.; Brunel, D.; Corma, A. Catalysis Using Multifunctional Organosiliceous Hybrid Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (9), 4083–4097. <https://doi.org/10.1039/C2CS35385G>.
- (137) Zhou, J. Recent Advances in Multicatalyst Promoted Asymmetric Tandem Reactions. *Chemistry – An Asian Journal* **2010**, *5* (3), 422–434. <https://doi.org/10.1002/asia.200900458>.
- (138) Li, H.; Qiu, C.; Cao, X.; Lu, Y.; Li, G.; He, X.; Lu, Q.; Chen, K.; Ouyang, P.; Tan, W. Artificial Nanometalloenzymes for Cooperative Tandem Catalysis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (17), 15718–15726. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b03616>.
- (139) Thomas, C. M.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes: Proteins as Hosts for Enantioselective Catalysis. *Chemical Society Reviews* **2005**, *34* (4), 337. <https://doi.org/10.1039/b314695m>.
- (140) Jagadeesan, D.; Vernekar, D.; Gupta, S.; Jaiswal, G. New Opportunities in Heterogeneous Catalysis. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* **2018**, *85* (1), 23–41. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2018/49504>.
- (141) Schwartz, T. J.; Goodman, S. M.; Osmundsen, C. M.; Taarning, E.; Mozuch, M. D.; Gaskell, J.; Cullen, D.; Kersten, P. J.; Dumesic, J. A. Integration of Chemical and Biological Catalysis: Production of Furylglycolic Acid from Glucose via

- Cortalcerone. *ACS Catal.* **2013**, *3* (12), 2689–2693. <https://doi.org/10.1021/cs400593p>.
- (142) Yamashita, Y.; Kobayashi, S. Metal Amides as the Simplest Acid/Base Catalysts for Stereoselective Carbon–Carbon Bond-Forming Reactions. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (29), 9420–9427. <https://doi.org/10.1002/chem.201300908>.
- (143) Dumeignil, F.; Guehl, M.; Gimbernat, A.; Capron, M.; Ferreira, N. L.; Froidevaux, R.; Girardon, J.-S.; Wojcieszak, R.; Dhulster, P.; Delcroix, D. From Sequential Chemoenzymatic Synthesis to Integrated Hybrid Catalysis: Taking the Best of Both Worlds to Open up the Scope of Possibilities for a Sustainable Future. *Catalysis Science & Technology* **2018**, *8* (22), 5708–5734. <https://doi.org/10.1039/C8CY01190G>.
- (144) Jiang, Q.; Xiao, Y.; Hong, A. N.; Shen, Y.; Li, Z.; Feng, P.; Zhong, W. Highly Stable Fe/Co-TPY-MIL-88(NH<sub>2</sub>) Metal–Organic Framework (MOF) in Enzymatic Cascade Reactions for Chemiluminescence-Based Detection of Extracellular Vesicles. *ACS Sens.* **2023**, *8* (4), 1658–1666. <https://doi.org/10.1021/acssensors.2c02791>.
- (145) Han, J.; Zhuo, Y.; Chai, Y.; Gui, G.; Zhao, M.; Zhu, Q.; Yuan, R. A Signal Amplification Strategy Using the Cascade Catalysis of Gold Nanoclusters and Glucose Dehydrogenase for Ultrasensitive Detection of Thrombin. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *50*, 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.035>.
- (146) Yehezkeli, O.; Yan, Y.-M.; Baravik, I.; Tel-Vered, R.; Willner, I. Integrated Oligoaniline-Cross-Linked Composites of Au Nanoparticles/Glucose Oxidase Electrodes: A Generic Paradigm for Electrically Contacted Enzyme Systems. *Chemistry - A European Journal* **2009**, *15* (11), 2674–2679. <https://doi.org/10.1002/chem.200801609>.
- (147) Yan, Y.-M.; Baravik, I.; Tel-Vered, R.; Willner, I. An Ethanol/O<sub>2</sub> Biofuel Cell Based on an Electropolymerized Bilirubin Oxidase/Pt Nanoparticle Bioelectrocatalytic O<sub>2</sub>-Reduction Cathode. *Advanced Materials* **2009**, *21* (42), 4275–4279. <https://doi.org/10.1002/adma.200900206>.
- (148) Baravik, I.; Tel-Vered, R.; Ovits, O.; Willner, I. Electrical Contacting of Redox Enzymes by Means of Oligoaniline-Cross-Linked Enzyme/Carbon Nanotube Composites †. *Langmuir* **2009**, *25* (24), 13978–13983. <https://doi.org/10.1021/la902074w>.
- (149) Bahshi, L.; Frascioni, M.; Tel-Vered, R.; Yehezkeli, O.; Willner, I. Following the Biocatalytic Activities of Glucose Oxidase by Electrochemically Cross-Linked Enzyme–Pt Nanoparticles Composite Electrodes. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (21), 8253–8259. <https://doi.org/10.1021/ac801398m>.
- (150) Dagan-Moscovich, H.; Cohen-Hadar, N.; Porat, C.; Rishpon, J.; Shacham-Diamand, Y.; Freeman, A. Nanowiring of the Catalytic Site of Novel Molecular Enzyme–Metal Hybrids to Electrodes. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (15), 5766–5769. <https://doi.org/10.1021/jp066100u>.
- (151) Liu, J.; Lu, Y. A Colorimetric Lead Biosensor Using DNAzyme-Directed Assembly of Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (22), 6642–6643. <https://doi.org/10.1021/ja034775u>.
- (152) Wu, J.; Li, S.; Wei, H. Integrated Nanozymes: Facile Preparation and Biomedical Applications. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (50), 6520–6530. <https://doi.org/10.1039/c8cc01202d>.
- (153) Tel-Vered, R.; Willner, I. Bis-Aniline-Crosslinked Enzyme-Metal Nanoparticle Composites on Electrodes for Bioelectronic Applications. *Israel Journal of Chemistry* **2010**, *50* (3), 321–332. <https://doi.org/10.1002/ijch.201000023>.
- (154) Zayats, M.; Willner, B.; Willner, I. Design of Amperometric Biosensors and Biofuel Cells by the Reconstitution of Electrically Contacted Enzyme Electrodes. *Electroanalysis* **2008**, *20* (6), 583–601. <https://doi.org/10.1002/elan.200704128>.
- (155) Willner, I.; Yan, Y.-M.; Willner, B.; Tel-Vered, R. Integrated Enzyme-Based Biofuel Cells—A Review. *Fuel Cells* **2009**, *9* (1), 7–24. <https://doi.org/10.1002/fuce.200800115>.
- (156) Zhang, S.; Wang, C.; Chang, H.; Zhang, Q.; Cheng, Y. Off-on Switching of Enzyme Activity by near-Infrared Light-Induced Photothermal Phase Transition of Nanohybrids. *Sci. Adv.* **2019**, *5* (8), eaaw4252. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw4252>.
- (157) Wang, C.; Zhang, Q.; Wang, X.; Chang, H.; Zhang, S.; Tang, Y.; Xu, J.; Qi, R.; Cheng, Y. Dynamic Modulation of Enzyme Activity by Near-Infrared Light. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56* (24), 6767–6772. <https://doi.org/10.1002/anie.201700968>.
- (158) Avenier, F.; Ghattas, W.; Ricoux, R.; Mahy, J.-P. Recent Progress in the Development of New Artificial Metalloenzymes as Biocatalysts for Selective Oxidations and Diels-Alder Reaction -Mini-Review. *Vietnam Journal of Chemistry* **2020**, *58* (4), 423–433. <https://doi.org/10.1002/vjch.202000033>.
- (159) Mahy, J.-P.; Avenier, F.; Ghattas, W.; Ricoux, R.; Salmain, M. Current Applications of Artificial Metalloenzymes and Future Developments. In *Enzymes for Solving Humankind's Problems*; 2020; pp 363–411. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-58315-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-58315-6_12).
- (160) Okamoto, Y.; Köhler, V.; Paul, C. E.; Hollmann, F.; Ward, T. R. Efficient In Situ Regeneration of NADH Mimics by an Artificial Metalloenzyme. *ACS Catal.* **2016**, *6* (6), 3553–3557. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b00258>.
- (161) Zhang, H.; Liang, X.; Han, L.; Li, F. “Non-Naked” Gold with Glucose Oxidase-Like Activity: A Nanozyme for Tandem Catalysis. *Small* **2018**, *14* (44), 1803256. <https://doi.org/10.1002/sml.201803256>.
- (162) Liu, J.; Fu, S.; Yuan, B.; Li, Y.; Deng, Z. Toward a Universal “Adhesive Nanosheet” for the Assembly of Multiple Nanoparticles Based on a Protein-Induced Reduction/Decoration of Graphene Oxide. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (21), 7279–7281. <https://doi.org/10.1021/ja100938r>.
- (163) Naapuri, J. M.; Aberg, G. A.; Palomo, J. M.; Deska, J. Arylative Allenol Cyclization via Sequential One-Pot Enzyme & Palladium Catalysis. *ChemCatChem* **2021**, *13* (2), 763–769. <https://doi.org/10.1002/cctc.202001619>.
- (164) Li, Z.; Ding, Y.; Wu, X.; Ge, J.; Ouyang, P.; Liu, Z. An Enzyme–Copper Nanoparticle Hybrid Catalyst Prepared from Disassembly of an Enzyme–Inorganic Nanocrystal Three-Dimensional Nanostructure. *RSC Adv.* **2016**, *6* (25), 20772–20776. <https://doi.org/10.1039/C5RA27904F>.

- (165) Filice, M.; Marciello, M.; del Puerto Morales, M.; Palomo, J. M. Synthesis of Heterogeneous Enzyme–Metal Nanoparticle Biohybrids in Aqueous Media and Their Applications in C–C Bond Formation and Tandem Catalysis. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (61), 6876–6878. <https://doi.org/10.1039/C3CC42475H>.
- (166) San, B. H.; Kim, S.; Moh, S. H.; Lee, H.; Jung, D.-Y.; Kim, K. K. Platinum Nanoparticles Encapsulated by Aminopeptidase: A Multifunctional Bioinorganic Nanohybrid Catalyst. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50 (50), 11924–11929. <https://doi.org/10.1002/anie.201101833>.
- (167) Júnior, A. A. da T.; Ladeira, Y. F. X.; França, A. da S.; Souza, R. O. M. A. de; Moraes, A. H.; Wojcieszak, R.; Itabaiana, I.; Miranda, A. S. de. Multicatalytic Hybrid Materials for Biocatalytic and Chemoenzymatic Cascades—Strategies for Multicatalyst (Enzyme) Co-Immobilization. *Catalysts* **2021**, 11 (8), 936. <https://doi.org/10.3390/catal11080936>.
- (168) Engström, K.; Johnston, E. V.; Verho, O.; Gustafson, K. P. J.; Shakeri, M.; Tai, C.-W.; Bäckvall, J.-E. Co-Immobilization of an Enzyme and a Metal into the Compartments of Mesoporous Silica for Cooperative Tandem Catalysis: An Artificial Metalloenzyme. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52 (52), 14006–14010. <https://doi.org/10.1002/anie.201306487>.
- (169) Långvik, O.; Saloranta, T.; Murzin, D. Y.; Leino, R. Heterogeneous Chemoenzymatic Catalyst Combinations for One-Pot Dynamic Kinetic Resolution Applications. *ChemCatChem* **2015**, 7 (24), 4004–4015. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500459>.
- (170) Pàmies, O.; Bäckvall, J.-E. Combination of Enzymes and Metal Catalysts. A Powerful Approach in Asymmetric Catalysis. *Chem. Rev.* **2003**, 103 (8), 3247–3262. <https://doi.org/10.1021/cr020029g>.
- (171) Pàmies, O.; Bäckvall, J.-E. Combined Metal Catalysis and Biocatalysis for an Efficient Deracemization Process. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, 14 (4), 407–413. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00097-1).
- (172) Kim, M.-J.; Ahn, Y.; Park, J. Dynamic Kinetic Resolutions and Asymmetric Transformations by Enzymes Coupled with Metal Catalysis. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, 13 (6), 578–587. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00347-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00347-6).
- (173) Huerta, F. F.; Minidis, A. B. E.; Bäckvall, J.-E. Racemisation in Asymmetric Synthesis. Dynamic Kinetic Resolution and Related Processes in Enzyme and Metal Catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, 30 (6), 321–331. <https://doi.org/10.1039/B105464N>.
- (174) Görbe, T.; Gustafson, K. P. J.; Verho, O.; Kervefors, G.; Zheng, H.; Zou, X.; Johnston, E. V.; Bäckvall, J.-E. Design of a Pd(0)-CalB CLEA Biohybrid Catalyst and Its Application in a One-Pot Cascade Reaction. *ACS Catal.* **2017**, 7 (3), 1601–1605. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b03481>.
- (175) Wang, Q.; Zhang, X.; Huang, L.; Zhang, Z.; Dong, S. GOx@ZIF-8(NiPd) Nanoflower: An Artificial Enzyme System for Tandem Catalysis. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, 56 (50), 16082–16085. <https://doi.org/10.1002/anie.201710418>.
- (176) Wang, X.; Yiu, H. H. P. Heterogeneous Catalysis Mediated Cofactor NADH Regeneration for Enzymatic Reduction. *ACS Catal.* **2016**, 6 (3), 1880–1886. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b02820>.
- (177) Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Buehler, K. Biocatalytic Redox Reactions for Organic Synthesis: Nonconventional Regeneration Methods. *ChemCatChem* **2010**, 2 (7), 762–782. <https://doi.org/10.1002/cctc.201000069>.
- (178) Ganesan, V.; Kim, J. J.; Shin, J.; Park, K.; Yoon, S. Efficient Nicotinamide Adenine Dinucleotide Regeneration with a Rhodium–Carbene Catalyst and Isolation of a Hydride Intermediate. *Inorg. Chem.* **2022**, 61 (15), 5683–5690. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c00059>.
- (179) Zhao, L.-J.; Yin, Z.; Shi, Y.; Sun, W.; Sun, L.; Su, H.; Sun, X.; Zhang, W.; Xia, L.; Qi, C. A Highly Active Cp\*Ir Complex with an Anionic N,N-Donor Chelate Ligand Catalyzes the Robust Regeneration of NADH under Physiological Conditions. *Catal. Sci. Technol.* **2021**, 11 (24), 7982–7991. <https://doi.org/10.1039/D1CY01458G>.
- (180) Maenaka, Y.; Suenobu, T.; Fukuzumi, S. Hydrogen Evolution from Aliphatic Alcohols and 1,4-Selective Hydrogenation of NAD<sup>+</sup> Catalyzed by a [C,N] and a [C,C] Cyclometalated Organoiridium Complex at Room Temperature in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (22), 9417–9427. <https://doi.org/10.1021/ja302788c>.
- (181) Maenaka, Y.; Suenobu, T.; Fukuzumi, S. Efficient Catalytic Interconversion between NADH and NAD<sup>+</sup> Accompanied by Generation and Consumption of Hydrogen with a Water-Soluble Iridium Complex at Ambient Pressure and Temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (1), 367–374. <https://doi.org/10.1021/ja207785f>.
- (182) Marrone, A.; Fish, R. H. Bioorganometallic Chemistry at the Interface with Biocatalysis: Chemoselective Reduction of Biomimetic NAD<sup>+</sup> Cofactors with [Cp\*Rh(Bpy)H]<sup>+</sup>, Tandem Catalysis with 1,4-NADH-Dependent Enzymes, Chiral Synthesis, Organotin Metabolites, and DFT Mechanism Studies. *Organometallics* **2023**, 42 (4), 288–306. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.2c00550>.
- (183) Qiu, S.; Xu, S.-Y.; Wang, Y.-J.; Zheng, Y.-G. Chemoenzymatic Catalysis of Tert-Butyl 6-Cyano-(3R,5R)-Dihydroxyhexanoate by Aldo-Keto Reductase Coupled with Composite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanozyme Scaffold. *Chemical Engineering Science* **2022**, 261, 117935. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2022.117935>.
- (184) Poizat, M.; Arends, I. W. C. E.; Hollmann, F. On the Nature of Mutual Inactivation between [Cp\*Rh(Bpy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> and Enzymes – Analysis and Potential Remedies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, 63 (3), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.006>.
- (185) Canivet, J.; Süß-Fink, G.; Štěpnička, P. Water-Soluble Phenanthroline Complexes of Rhodium, Iridium and Ruthenium for the Regeneration of NADH in the Enzymatic Reduction of Ketones. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2007**, 2007 (30), 4736–4742. <https://doi.org/10.1002/ejic.200700505>.
- (186) Hollmann, F.; Kleeb, A.; Otto, K.; Schmid, A. Coupled Chemoenzymatic Transfer Hydrogenation Catalysis for Enantioselective Reduction and Oxidation Reactions. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16 (21), 3512–3519. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.09.026>.
- (187) Hilt, G.; Steckhan, E. Transition Metal Complexes of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione as Efficient Mediators for the Regeneration of NAD<sup>+</sup> in Enzymatic Synthesis. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, No. 22, 1706–1707.

<https://doi.org/10.1039/C39930001706>.

- (188) Westerhausen, V. D.; Herrmann, S.; Hummel, W.; Steckhan, E. Formate-Driven, Non-Enzymatic NAD(P)H Regeneration for the Alcohol Dehydrogenase Catalyzed Stereoselective Reduction of 4-Phenyl-2-Butanone. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1992**, *31* (11), 1529–1531. <https://doi.org/10.1002/anie.199215291>.
- (189) Steckhan, E.; Herrmann, S.; Ruppert, R.; Thömmes, J.; Wandrey, C. Continuous Generation of NADH from NAD<sup>+</sup> and Formate Using a Homogeneous Catalyst with Enhanced Molecular Weight in a Membrane Reactor. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1990**, *29* (4), 388–390. <https://doi.org/10.1002/anie.199003881>.
- (190) Zhang, Y.; Wei, B.; Liang, H. Rhodium-Based MOF-on-MOF Difunctional Core–Shell Nanoreactor for NAD(P)H Regeneration and Enzyme Directed Immobilization. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15* (2), 3442–3454. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c18440>.
- (191) Bernard, J.; van Heerden, E.; Arends, I. W. C. E.; Opperman, D. J.; Hollmann, F. Chemoenzymatic Reduction of Conjugated C=C Double Bonds. *ChemCatChem* **2012**, *4* (2), 196–199. <https://doi.org/10.1002/cctc.201100312>.
- (192) Hollmann, F.; Witholt, B.; Schmid, A. [Cp\*Rh(Bpy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup>: A Versatile Tool for Efficient and Non-Enzymatic Regeneration of Nicotinamide and Flavin Coenzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, *19–20*, 167–176. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00164-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00164-9).
- (193) Ruppert, R.; Herrmann, S.; Steckhan, E. Efficient Indirect Electrochemical In-Situ Regeneration of NADH: Electrochemically Driven Enzymatic Reduction of Pyruvate Catalyzed by d-Ldh. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28* (52), 6583–6586. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)96919-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)96919-3).
- (194) Gimbernat, A.; Guehl, M.; Capron, M.; Lopes Ferreira, N.; Froidevaux, R.; Girardon, J.-S.; Dhulster, P.; Delcroix, D.; Dumeignil, F. Hybrid Catalysis: A Suitable Concept for the Valorization of Biosourced Saccharides to Value-Added Chemicals. *ChemCatChem* **2017**, *9* (12), 2080–2084. <https://doi.org/10.1002/cctc.201601633>.
- (195) Hafenstine, G. R.; Ma, K.; Harris, A. W.; Yehezkeli, O.; Park, E.; Domaille, D. W.; Cha, J. N.; Goodwin, A. P. Multicatalytic, Light-Driven Upgrading of Butanol to 2-Ethylhexenal and Hydrogen under Mild Aqueous Conditions. *ACS Catal.* **2017**, *7* (1), 568–572. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b03213>.
- (196) Maid, H.; Böhm, P.; Huber, S. M.; Bauer, W.; Hummel, W.; Jux, N.; Gröger, H. Iron Catalysis for In Situ Regeneration of Oxidized Cofactors by Activation and Reduction of Molecular Oxygen: A Synthetic Metalloporphyrin as a Biomimetic NAD(P)H Oxidase. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (10), 2397–2400. <https://doi.org/10.1002/anie.201004101>.
- (197) Liu, J.; Antonietti, M. Bio-Inspired NADH Regeneration by Carbon Nitride Photocatalysis Using Diatom Templates. *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6* (5), 1486–1493. <https://doi.org/10.1039/C3EE40696B>.
- (198) Zhao, X.; Cleary, S. E.; Zor, C.; Grobert, N.; Reeve, H. A.; Vincent, K. A. Chemo-Bio Catalysis Using Carbon Supports: Application in H<sub>2</sub>-Driven Cofactor Recycling. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (23), 8105–8114. <https://doi.org/10.1039/D1SC00295C>.
- (199) Poznansky, B.; Cleary, S. E.; Thompson, L. A.; Reeve, H. A.; Vincent, K. A. Boosting the Productivity of H<sub>2</sub>-Driven Biocatalysis in a Commercial Hydrogenation Flow Reactor Using H<sub>2</sub> From Water Electrolysis. *Frontiers in Chemical Engineering* **2021**, *3*.
- (200) Zhang, W.; Fueyo, E. F.; Hollmann, F.; Martin, L. L.; Pesic, M.; Wardenga, R.; Hoehne, M.; Schmidt, S. Combining Photo-Organic Redox- and Enzyme Catalysis Facilitates Asymmetric C–H Bond Functionalization. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, No. 1, 80–84. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201801692>.
- (201) Schaaf, P.; Bayer, T.; Koley, M.; Schnürch, M.; Bornscheuer, U. T.; Rudroff, F.; Mihovilovic, M. D. Biocompatible Metal-Assisted C–C Cross-Coupling Combined with Biocatalytic Chiral Reductions in a Concurrent Tandem Cascade. *Chemical Communications* **2018**, *54* (92), 12978–12981. <https://doi.org/10.1039/C8CC05304A>.
- (202) Scalacci, N.; Black, G. W.; Mattedi, G.; Brown, N. L.; Turner, N. J.; Castagnolo, D. Unveiling the Biocatalytic Aromatizing Activity of Monoamine Oxidases MAO-N and 6-HDNO: Development of Chemoenzymatic Cascades for the Synthesis of Pyrroles. *ACS Catal.* **2017**, *7* (2), 1295–1300. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b03081>.
- (203) Pesci, L.; Baydar, M.; Glueck, S.; Faber, K.; Liese, A.; Kara, S. Development and Scaling-Up of the Fragrance Compound 4-Ethylguaiaicol Synthesis via a Two-Step Chemo-Enzymatic Reaction Sequence. *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21* (1), 85–93. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00362>.
- (204) Latham, J.; Henry, J.-M.; Sharif, H. H.; Menon, B. R. K.; Shepherd, S. A.; Greaney, M. F.; Micklefield, J. Integrated Catalysis Opens New Arylation Pathways via Regiodivergent Enzymatic C–H Activation. *Nat Commun* **2016**, *7* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms11873>.
- (205) Sato, H.; Hummel, W.; Gröger, H. Cooperative Catalysis of Noncompatible Catalysts through Compartmentalization: Wacker Oxidation and Enzymatic Reduction in a One-Pot Process in Aqueous Media. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (15), 4488–4492. <https://doi.org/10.1002/anie.201409590>.
- (206) Gimbernat, A.; Guehl, M.; Lopes Ferreira, N.; Heuson, E.; Dhulster, P.; Capron, M.; Dumeignil, F.; Delcroix, D.; Girardon, J.-S.; Froidevaux, R. From a Sequential Chemo-Enzymatic Approach to a Continuous Process for HMF Production from Glucose. *Catalysts* **2018**, *8* (8), 335. <https://doi.org/10.3390/catal8080335>.
- (207) Makkee, M.; Kieboom, A. P. G.; Bekkum, H. V.; Roels, J. A. Combined Action of Enzyme and Metal Catalyst, Applied to the Preparation of D-Mannitol. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1980**, No. 19, 930–931. <https://doi.org/10.1039/C39800000930>.
- (208) Schoevaart, R.; Kieboom, T. Combined Catalytic Conversion Involving an Enzyme, a Homogeneous and a Heterogeneous Catalyst: One-Pot Preparation of 4-Deoxy-d-Glucose Derivatives from d-Galactose. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*

- (18), 3399–3400. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)00479-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)00479-3).
- (209) Edin, M.; Bäckvall, J.-E.; Córdova, A. Tandem Enantioselective Organo- and Biocatalysis: A Direct Entry for the Synthesis of Enantiomerically Pure Aldols. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45* (41), 7697–7701. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.08.079>.
- (210) Duxbury, C. J.; Wang, W.; de Geus, M.; Heise, A.; Howdle, S. M. Can Block Copolymers Be Synthesized by a Single-Step Chemoenzymatic Route in Supercritical Carbon Dioxide? *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (8), 2384–2385. <https://doi.org/10.1021/ja042903o>.
- (211) Sugiyama, M.; Hong, Z.; Liang, P.-H.; Dean, S. M.; Whalen, L. J.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H. D-Fructose-6-Phosphate Aldolase-Catalyzed One-Pot Synthesis of Iminocyclitols. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (47), 14811–14817. <https://doi.org/10.1021/ja073911i>.
- (212) Ye, R.; Zhao, J.; Wickemeyer, B. B.; Toste, F. D.; Somorjai, G. A. Foundations and Strategies of the Construction of Hybrid Catalysts for Optimized Performances. *Nat. Catal.* **2018**, *1* (5), 318–325. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0052-2>.
- (213) Ríos-Lombardía, N.; García-Álvarez, J.; González-Sabín, J. One-Pot Combination of Metal- and Bio-Catalysis in Water for the Synthesis of Chiral Molecules. *Catalysts* **2018**, *8* (2), 75. <https://doi.org/10.3390/catal8020075>.
- (214) Rudroff, F.; Mihovilovic, M. D.; Gröger, H.; Snajdrova, R.; Iding, H.; Bornscheuer, U. T. Opportunities and Challenges for Combining Chemo- and Biocatalysis. *Nature Catalysis* **2018**, *1* (1), 12–22. <https://doi.org/10.1038/s41929-017-0010-4>.
- (215) Bisogno, F. R.; López-Vidal, M. G.; de Gonzalo, G. Organocatalysis and Biocatalysis Hand in Hand: Combining Catalysts in One-Pot Procedures. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2017**, *359* (12), 2026–2049. <https://doi.org/10.1002/adsc.201700158>.
- (216) Wang, Y.; Zhao, H. Tandem Reactions Combining Biocatalysts and Chemical Catalysts for Asymmetric Synthesis. *Catalysts* **2016**, *6* (12), 194. <https://doi.org/10.3390/catal6120194>.
- (217) Guajardo, N.; Müller, C. R.; Schrebler, R.; Carlesi, C.; Domínguez de María, P. Deep Eutectic Solvents for Organocatalysis, Biotransformations, and Multistep Organocatalyst/Enzyme Combinations. *ChemCatChem* **2016**, *8* (6), 1020–1027. <https://doi.org/10.1002/cctc.201501133>.
- (218) Muschiol, J.; Peters, C.; Oberleitner, N.; Mihovilovic, M. D.; Bornscheuer, U. T.; Rudroff, F. Cascade Catalysis – Strategies and Challenges En Route to Preparative Synthetic Biology. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (27), 5798–5811. <https://doi.org/10.1039/C4CC08752F>.
- (219) Lohr, T. L.; Marks, T. J. Orthogonal Tandem Catalysis. *Nature Chem* **2015**, *7* (6), 477–482. <https://doi.org/10.1038/nchem.2262>.
- (220) Gröger, H. Metals and Metal Complexes in Cooperative Catalysis with Enzymes within Organic-Synthetic One-Pot Processes. In *Cooperative Catalysis*; Peters, R., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2015; pp 325–350. <https://doi.org/10.1002/9783527681020.ch11>.
- (221) Gröger, H.; Hummel, W. Combining the ‘Two Worlds’ of Chemocatalysis and Biocatalysis towards Multi-Step One-Pot Processes in Aqueous Media. *Current Opinion in Chemical Biology* **2014**, *19*, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.03.002>.
- (222) Denard, C. A.; Hartwig, J. F.; Zhao, H. Multistep One-Pot Reactions Combining Biocatalysts and Chemical Catalysts for Asymmetric Synthesis. *ACS Catalysis* **2013**, *3* (12), 2856–2864. <https://doi.org/10.1021/cs400633a>.
- (223) González-Granda, S.; Escot, L.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V. Chemoenzymatic Cascades Combining Biocatalysis and Transition Metal Catalysis for Asymmetric Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2023**. <https://doi.org/10.1002/anie.202217713>.
- (224) Anderson, M.; Afewerki, S.; Berglund, P.; Córdova, A. Total Synthesis of Capsaicin Analogues from Lignin-Derived Compounds by Combined Heterogeneous Metal, Organocatalytic and Enzymatic Cascades in One Pot. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2014**, *356* (9), 2113–2118. <https://doi.org/10.1002/adsc.201301148>.
- (225) Wu, Y.; Shi, J.; Mei, S.; Katimba, H. A.; Sun, Y.; Wang, X.; Liang, K.; Jiang, Z. Concerted Chemoenzymatic Synthesis of  $\alpha$ -Keto Acid through Compartmentalizing and Channeling of Metal–Organic Frameworks. *ACS Catal.* **2020**, 9664–9673. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c01985>.
- (226) Liardo, E.; González-Fernández, R.; Ríos-Lombardía, N.; Moris, F.; García-Álvarez, J.; Cadierno, V.; Crochet, P.; Rebollo, F.; González-Sabín, J. Strengthening the Combination between Enzymes and Metals in Aqueous Medium: Concurrent Ruthenium-Catalyzed Nitrile Hydration - Asymmetric Ketone Bioreduction. *ChemCatChem* **2018**, *10* (20), 4676–4682. <https://doi.org/10.1002/cctc.201801005>.
- (227) Cicco, L.; Ríos-Lombardía, N.; Rodríguez-Álvarez, M. J.; Moris, F.; Perna, F. M.; Capriati, V.; García-Álvarez, J.; González-Sabín, J. Programming Cascade Reactions Interfacing Biocatalysis with Transition-Metal Catalysis in Deep Eutectic Solvents as Biorenewable Reaction Media. *Green Chem.* **2018**, *20* (15), 3468–3475. <https://doi.org/10.1039/C8GC00861B>.
- (228) Ríos-Lombardía, N.; Vidal, C.; Liardo, E.; Moris, F.; García-Álvarez, J.; González-Sabín, J. From a Sequential to a Concurrent Reaction in Aqueous Medium: Ruthenium-Catalyzed Allylic Alcohol Isomerization and Asymmetric Bioreduction. *Angewandte Chemie* **2016**, *128* (30), 8833–8837. <https://doi.org/10.1002/ange.201601840>.
- (229) González-Granda, S.; Tzouras, N. V.; Nolan, S. P.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V. Merging Gold(I) Catalysis with Amine Transaminases in Cascade Catalysis: Chemoenzymatic Transformation of Propargylic Alcohols into Enantioenriched Allylic Amines. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2022**, *364* (22), 3856–3866. <https://doi.org/10.1002/adsc.202200777>.
- (230) Zhang, P.; Liao, X.; Ma, C.; Li, Q.; Li, A.; He, Y. Chemoenzymatic Conversion of Corncob to Furfurylamine via Tandem Catalysis with Tin-Based Solid Acid and Transaminase Biocatalyst. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, *7* (21), 17636–



17642. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b03510>.
- (231) Liardo, E.; Ríos-Lombardía, N.; Morís, F.; Rebollo, F.; González-Sabín, J. Hybrid Organo- and Biocatalytic Process for the Asymmetric Transformation of Alcohols into Amines in Aqueous Medium. *ACS Catalysis* **2017**, *7* (7), 4768–4774. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b01543>.
- (232) Ríos-Lombardía, N.; Vidal, C.; Cocina, M.; Morís, F.; García-Álvarez, J.; González-Sabín, J. Chemoenzymatic One-Pot Synthesis in an Aqueous Medium: Combination of Metal-Catalyzed Allylic Alcohol Isomerisation–Asymmetric Bioamination. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (54), 10937–10940. <https://doi.org/10.1039/C5CC03298A>.
- (233) Yuan, B.; Mahor, D.; Fei, Q.; Wever, R.; Alcalde, M.; Zhang, W.; Hollmann, F. Water-Soluble Anthraquinone Photocatalysts Enable Methanol-Driven Enzymatic Halogenation and Hydroxylation Reactions. *ACS Catal.* **2020**, *10* (15), 8277–8284. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c01958>.
- (234) Gastaldi, C.; Mekhloufi, G.; Forano, C.; Gautier, A.; Guérard-Hélaine, C. Mixing Chemo- and Biocatalysis for Rare Monosaccharide Production by Combining Aldolase and N-Heterocyclic Carbene Gold Catalysts. *Green Chem.* **2022**, *10.1039/D2GC00667G*. <https://doi.org/10.1039/D2GC00667G>.
- (235) Li, L.; Li, Q.; Di, J.; He, Y.; Ma, C. Improved Synthesis of Furfurylamine from a High Titer of Biomass-Derived Furfural by a Thermostable Triple Mutant  $\omega$ -Transaminase in a Three-Component Deep Eutectic Solvent ChCl/Lactic Acid/Malonic Acid System. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2023**, *11* (19), 7515–7525. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.3c00671>.
- (236) Yang, Q.; Tang, Z.; Xiong, J.; He, Y. Sustainable Chemoenzymatic Cascade Transformation of Corncob to Furfuryl Alcohol with Rice Husk-Based Heterogeneous Catalyst UST-Sn-RH. *Catalysts* **2022**, *13* (1), 37. <https://doi.org/10.3390/catal13010037>.
- (237) He, W.; He, Y.; Ye, J. Efficient Synthesis of Biobased Furoic Acid from Corncob via Chemoenzymatic Approach. *Processes* **2022**, *10* (4), 677. <https://doi.org/10.3390/pr10040677>.
- (238) Ni, J.; Li, Q.; Gong, L.; Liao, X.-L.; Zhang, Z.-J.; Ma, C.; He, Y. Highly Efficient Chemoenzymatic Cascade Catalysis of Biomass into Furfurylamine by a Heterogeneous Shrimp Shell-Based Chemocatalyst and an  $\omega$ -Transaminase Biocatalyst in Deep Eutectic Solvent–Water. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2021**, *9* (38), 13084–13095. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05109>.
- (239) Ni, J.; Di, J.; Ma, C.; He, Y. Valorisation of Corncob into Furfuryl Alcohol and Furoic Acid via Chemoenzymatic Cascade Catalysis. *Bioresour. Bioprocess.* **2021**, *8* (1), 113. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00466-3>.
- (240) Liang, J.; Zha, J.; Zhao, N.; Tang, Z.; He, Y.; Ma, C. Valorization of Waste Lignocellulose to Furfural by Sulfonated Biobased Heterogeneous Catalyst Using Ultrasonic-Treated Chestnut Shell Waste as Carrier. *Processes* **2021**, *9* (12), 2269. <https://doi.org/10.3390/pr9122269>.
- (241) Yang, D.; Ma, C.; Peng, B.; Xu, J.; He, Y. Synthesis of Furoic Acid from Biomass via Tandem Pretreatment and Biocatalysis. *Industrial Crops and Products* **2020**, *153*, 112580. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112580>.
- (242) Ma, Z.; Liao, X.; Ma, C.; He, Y.; Gong, C.; Yu, X. Chemoenzymatic Conversion of Sorghum Durra Stalk into Furoic Acid by a Sequential Microwave-Assisted Solid Acid Conversion and Immobilized Whole-Cells Biocatalysis. *Bioresour. Technology* **2020**, *311*, 123474. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123474>.
- (243) Qin, L.-Z.; He, Y. Chemoenzymatic Synthesis of Furfuryl Alcohol from Biomass in Tandem Reaction System. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2019**. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03154-3>.
- (244) Peng, B.; Ma, C.-L.; Zhang, P.-Q.; Wu, C.-Q.; Wang, Z.-W.; Li, A.-T.; He, Y.; Yang, B. An Effective Hybrid Strategy for Converting Rice Straw to Furoic Acid by Tandem Catalysis via Sn-Sepiolite Combined with Recombinant E. Coli Whole Cells Harboring Horse Liver Alcohol Dehydrogenase. *Green Chem.* **2019**, *21* (21), 5914–5923. <https://doi.org/10.1039/c9gc02499a>.
- (245) Huang, Y.; Liao, X.; Deng, Y.; He, Y. Co-Catalysis of Corncob with Dilute Formic Acid plus Solid Acid SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/SnO<sub>2</sub>-Montmorillonite under the Microwave for Enhancing the Biosynthesis of Furfuralcohol. *Catalysis Communications* **2019**, *120*, 38–41. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2018.10.021>.
- (246) Xue, X.-X.; Ma, C.-L.; Di, J.-H.; Huo, X.-Y.; He, Y. One-Pot Chemo-Enzymatic Conversion of D-Xylose to Furfuralcohol by Sequential Dehydration with Oxalic Acid plus Tin-Based Solid Acid and Bioreduction with Whole-Cells. *Bioresour. Technology* **2018**, *268*, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.152>.
- (247) Di, J.; Ma, C.; Qian, J.; Liao, X.; Peng, B.; He, Y. Chemo-Enzymatic Synthesis of Furfuralcohol from Chestnut Shell Hydrolysate by a Sequential Acid-Catalyzed Dehydration under Microwave and Escherichia Coli CCZU-Y10 Whole-Cells Conversion. *Bioresour. Technology* **2018**, *262*, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.038>.
- (248) He, Y.; Jiang, C.-X.; Jiang, J.-W.; Di, J.-H.; Liu, F.; Ding, Y.; Qing, Q.; Ma, C.-L. One-Pot Chemo-Enzymatic Synthesis of Furfuralcohol from Xylose. *Bioresour. Technology* **2017**, *238*, 698–705. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.101>.
- (249) He, Y.; Jiang, C.-X.; Chong, G.-G.; Di, J.-H.; Wu, Y.-F.; Wang, B.-Q.; Xue, X.-X.; Ma, C.-L. Chemical-Enzymatic Conversion of Corncob-Derived Xylose to Furfuralcohol by the Tandem Catalysis with SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/SnO<sub>2</sub>-Kaoline and E. Coli CCZU-T15 Cells in Toluene–Water Media. *Bioresour. Technology* **2017**, *245*, 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.219>.
- (250) He, Y.; Ding, Y.; Ma, C.; Di, J.; Jiang, C.; Li, A. One-Pot Conversion of Biomass-Derived Xylose to Furfuralcohol by a Chemo-Enzymatic Sequential Acid-Catalyzed Dehydration and Bioreduction. *Green Chem.* **2017**, *19* (16), 3844–3850. <https://doi.org/10.1039/C7GC01256J>.
- (251) Wang, Z.; Chai, H.; Ren, J.; Tao, Y.; Li, Q.; Ma, C.; Ai, Y.; He, Y. Biocatalytic Valorization of Biobased 5-

- Hydroxymethylfurfural to 5-Hydroxymethyl-2-Furfurylamine in a Three-Constituent Deep Eutectic Solvent–Water System. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2022**, *10* (26), 8452–8463. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c01481>.
- (252) Peng, Y.; Jiang, L.; Di, J.; Ma, C.; Li, Q.; He, Y. A Hybrid Process for Valorization of D-Fructose to 2,5-Bis(Hydroxymethyl)Furan by Bridging Chemocatalysis and Biocatalysis in a Betaine:Benzenesulfonic Acid System. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2022**, *10* (37), 12165–12176. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c02702>.
- (253) Xu, D.; Li, Q.; Ni, J.; He, Y.; Ma, C. Significant Enhancement of 5-Hydroxymethylfural Productivity from D-Fructose with SG(SiO<sub>2</sub>) in Betaine:Glycerol–Water for Efficient Synthesis of Biobased 5-(Hydroxymethyl)Furfurylamine. *Molecules* **2022**, *27* (18), 5748. <https://doi.org/10.3390/molecules27185748>.
- (254) Sirasani, G.; Tong, L.; Balskus, E. P. A Biocompatible Alkene Hydrogenation Merges Organic Synthesis with Microbial Metabolism. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (30), 7785–7788. <https://doi.org/10.1002/anie.201403148>.
- (255) Foulkes, J. M.; Malone, K. J.; Coker, V. S.; Turner, N. J.; Lloyd, J. R. Engineering a Biometallic Whole Cell Catalyst for Enantioselective Deracemization Reactions. *ACS Catal.* **2011**, *1* (11), 1589–1594. <https://doi.org/10.1021/cs200400t>.
- (256) Heuson, E.; Dumeignil, F. The Various Levels of Integration of Chemo- and Bio-Catalysis towards Hybrid Catalysis. *Catal. Sci. Technol.* **2020**, *10* (21), 7082–7100. <https://doi.org/10.1039/D0CY00696C>.
- (257) Heuson, E.; Froidevaux, R.; Itabaiana Jr, I.; Wojcieszak, R.; Capron, M.; Dumeignil, F. La catalyse, la diversité au service de l'efficacité. *L'Actualité Chimique* **2020**, No. 454, 7–10.
- (258) Heuson, E.; Froidevaux, R.; Itabaiana Jr, I.; Wojcieszak, R.; Capron, M.; Dumeignil, F. Des réactions multi-catalytiques au concept de catalyse hybride. *L'Actualité Chimique* **2020**, No. 454, 11–17.
- (259) Heuson, E.; Froidevaux, R.; Girardon, J.-S.; Itabaiana Jr, I.; Wojcieszak, R.; Capron, M.; Paul, S.; Dumeignil, F. Cinquante nuances de catalyse hybride. *L'Actualité Chimique* **2020**, No. 454, 18–26.
- (260) Heuson, E.; Froidevaux, R.; Itabaiana Jr, I.; Wojcieszak, R.; Capron, M.; Dumeignil, F. L'avènement des matériaux multi-catalytiques hybrides, vers une combinaison optimale des catalyseurs. *L'Actualité Chimique* **2020**, No. 454, 27–36.
- (261) Heuson, E.; Dibenedetto, A. 15 Hybrid Catalysis: Bridging Two Worlds for Greener Chemicals and Energy Production. In *Biorefinery: From Biomass to Chemicals and Fuels*; Aresta, M., Dibenedetto, A., Dumeignil, F., Eds.; De Gruyter, 2021; pp 493–536. <https://doi.org/10.1515/9783110705386-016>.
- (262) Froidevaux, V.; Negrell, C.; Caillol, S.; Pascual, J.-P.; Boutevin, B. Biobased Amines: From Synthesis to Polymers; Present and Future. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (22), 14181–14224. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00486>.
- (263) Chen, X.; Wang, J.; Huo, S.; Yang, S.; Zhang, B.; Cai, H. Preparation of Flame-Retardant Cyanate Ester with Low Dielectric Constants and Dissipation Factors Modified with Novel Phosphorus-Contained Schiff Base. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2019**, *135* (6), 3153–3164. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7507-1>.
- (264) Krishnamoorthy, K.; Subramani, D.; Eeda, N.; Muthukaruppan, A. Development and Characterization of Fully Bio-based Polybenzoxazine-silica Hybrid Composites for Low-k and Flame-retardant Applications. *Polymers for Advanced Technologies* **2019**, *30* (7), 1856–1864. <https://doi.org/10.1002/pat.4618>.
- (265) Holfinger, M. S.; Conner, A. H.; Holm, D. R.; Hill, C. G. Synthesis of Difurfuryl Diamines by the Acidic Condensation of Furfurylamine with Aldehydes and Their Mechanism of Formation. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60* (6), 1595–1598. <https://doi.org/10.1021/jo00111a017>.
- (266) Cawse, J. L.; Stanford, J. L.; Still, R. H. Polymers from Renewable Sources, 1. Diamines and Diisocyanates Containing Difurylalkane Moieties. *Die Makromolekulare Chemie* **1984**, *185* (4), 697–707. <https://doi.org/10.1002/macp.1984.021850408>.
- (267) Chatterjee, M.; Ishizaka, T.; Kawanami, H. Reductive Amination of Furfural to Furfurylamine Using Aqueous Ammonia Solution and Molecular Hydrogen: An Environmentally Friendly Approach. *Green Chemistry* **2016**, *18* (2), 487–496. <https://doi.org/10.1039/C5GC01352F>.
- (268) Jiang, S.; Ma, C.; Muller, E.; Pera-Titus, M.; Jérôme, F.; De Oliveira Vigier, K. Selective Synthesis of THF-Derived Amines from Biomass-Derived Carbonyl Compounds. *ACS Catalysis* **2019**, *9* (10), 8893–8902. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b03413>.
- (269) Wang, X.; Chen, W.; Li, Z.; Zeng, X.; Tang, X.; Sun, Y.; Lei, T.; Lin, L. Synthesis of Bis(Amino)Furans from Biomass Based 5-Hydroxymethyl Furfural. *Journal of Energy Chemistry* **2018**, *27* (1), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2017.06.015>.
- (270) Xu, Z.; Yan, P.; Xu, W.; Jia, S.; Xia, Z.; Chung, B.; Zhang, Z. C. Direct Reductive Amination of 5-Hydroxymethylfurfural with Primary/Secondary Amines via Ru-Complex Catalyzed Hydrogenation. *RSC Adv.* **2014**, *4* (103), 59083–59087. <https://doi.org/10.1039/C4RA10349A>.
- (271) Ayedi, M. A.; Bigot, Y. L.; Ammar, H.; Abid, S.; Gharbi, R. E.; Delmas, M. SIMPLE, NOVEL SYNTHESIS OF FURFURYLAMINE FROM FURFURAL BY ONE-POT REDUCTIVE AMINATION IN WATER USING ZINC METAL. **2012**, *8*.
- (272) Hu, L.; He, A.; Liu, X.; Xia, J.; Xu, J.; Zhou, S.; Xu, J. Biocatalytic Transformation of 5-Hydroxymethylfurfural into High-Value Derivatives: Recent Advances and Future Aspects. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2018**, *6* (12), 15915–15935. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b04356>.
- (273) Dunbabin, A.; Subrizi, F.; Ward, J. M.; Sheppard, T. D.; Hailes, H. C. Furfurylamines from Biomass: Transaminase Catalysed Upgrading of Furfurals. *Green Chem.* **2017**, *19* (2), 397–404. <https://doi.org/10.1039/c6gc02241c>.
- (274) Mathew, S.; Yun, H. Omega-Transaminases for the Production of Optically Pure Amines and Unnatural Amino Acids. *ACS Catalysis* **2012**, *2* (6), 993–1001. <https://doi.org/10.1021/cs300116n>.
- (275) Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. Biocatalytic Routes to Optically Active Amines. *ChemCatChem* **2009**, *1* (1), 42–51.

<https://doi.org/10.1002/cctc.200900110>.

- (276) Petri, A.; Masia, G.; Piccolo, O. Biocatalytic Conversion of 5-Hydroxymethylfurfural: Synthesis of 2,5-Bis(Hydroxymethyl)Furan and 5-(Hydroxymethyl)Furfurylamine. *Catalysis Communications* **2018**, *114*, 15–18. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2018.05.011>.
- (277) Sharma, M.; Kumar, P.; Singh, H.; Chakraborty, T. K. Preferential Cyclotrimerization of 5-(Aminomethyl)-2-Furancarboxylic Acid (AMFC): Electrostatic and Orbital Interactions Studies. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2006**, *764* (1–3), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2006.02.010>.
- (278) Chakraborty, T. K.; Tapadar, S.; Kiran Kumar, S. Cyclic Trimer of 5-(Aminomethyl)-2-Furancarboxylic Acid as a Novel Synthetic Receptor for Carboxylate Recognition. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43* (7), 1317–1320. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)02367-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)02367-X).
- (279) Lancien, A.; Wojcieszak, R.; Cuvelier, E.; Duban, M.; Dhulster, P.; Paul, S.; Dumeignil, F.; Froidevaux, R.; Heuson, E. Hybrid Conversion of 5-Hydroxymethylfurfural to 5-Aminomethyl-2-Furancarboxylic Acid: Toward New Bio-Sourced Polymers. *ChemCatChem* **2021**, *13*, 247–259. <https://doi.org/10.1002/cctc.202001446>.
- (280) Lelièvre, C. M.; Balandras, M.; Petit, J.-L.; Vergne-Vaxelaire, C.; Zapparucha, A. ATP Regeneration System in Chemoenzymatic Amide Bond Formation with Thermophilic CoA Ligase. *ChemCatChem* **2020**, *12* (4), 1184–1189. <https://doi.org/10.1002/cctc.201901870>.
- (281) Philpott, H. K.; Thomas, P. J.; Tew, D.; Fuerst, D. E.; Lovelock, S. L. A Versatile Biosynthetic Approach to Amide Bond Formation. *Green Chem.* **2018**, *20* (15), 3426–3431. <https://doi.org/10.1039/C8GC01697F>.
- (282) Mori, T.; Wanibuchi, K.; Morita, H.; Abe, I. Amide Bond Formation Using 4-Coumarate: CoA Ligase from *Arabidopsis Thaliana*. *Chem. Pharm. Bull.* **2021**, *69* (8), 717–720. <https://doi.org/10.1248/cpb.c21-00404>.
- (283) Abe, T.; Hashimoto, Y.; Hosaka, H.; Tomita-Yokotani, K.; Kobayashi, M. Discovery of Amide (Peptide) Bond Synthetic Activity in Acyl-CoA Synthetase. *J Biol Chem* **2008**, *283* (17), 11312–11321. <https://doi.org/10.1074/jbc.m709654200>.
- (284) González-Granda, S.; Albarrán-Velo, J.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V. Expanding the Synthetic Toolbox through Metal–Enzyme Cascade Reactions. *Chem. Rev.* **2023**. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00454>.
- (285) Gröger, H.; Gallou, F.; Lipshutz, B. H. Where Chemocatalysis Meets Biocatalysis: In Water. *Chem. Rev.* **2022**, *acs.chemrev.2c00416*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00416>.
- (286) Bering, L.; Thompson, J.; Micklefield, J. New Reaction Pathways by Integrating Chemo- and Biocatalysis. *Trends in Chemistry* **2022**, *S2589597422000703*. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2022.02.008>.
- (287) Wang, Y.; Ren, H.; Zhao, H. Expanding the Boundary of Biocatalysis: Design and Optimization of in Vitro Tandem Catalytic Reactions for Biochemical Production. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *53* (2), 115–129. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1431201>.
- (288) Metzger, K. E.; Moyer, M. M.; Trewyn, B. G. Tandem Catalytic Systems Integrating Biocatalysts and Inorganic Catalysts Using Functionalized Porous Materials. *ACS Catal.* **2021**, *11* (1), 110–122. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c04488>.
- (289) Debecker, D. P.; Smeets, V.; Van der Verren, M.; Meersseman Arango, H.; Kinnaer, M.; Devred, F. Hybrid Chemoenzymatic Heterogeneous Catalysts. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2021**, *28*, 100437. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100437>.
- (290) Heuson, E.; Froidevaux, R.; Itabaiana, I.; Wojcieszak, R.; Capron, M.; Dumeignil, F. Optimisation of Catalysts Coupling in Multi-Catalytic Hybrid Materials: Perspectives for the next Revolution in Catalysis. *Green Chem.* **2021**, *23* (5), 1942–1954. <https://doi.org/10.1039/D0GC04172F>.
- (291) Li, X.; Cao, Y.; Luo, K.; Zhang, L.; Bai, Y.; Xiong, J.; Zare, R. N.; Ge, J. Cooperative Catalysis by a Single-Atom Enzyme-Metal Complex. *Nat Commun* **2022**, *13* (1), 2189. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29900-6>.
- (292) Gustafson, K. P. J.; Gorbe, T.; de Gonzalo, G.; Yuan, N.; Schreiber, C. L.; Shchukarev, A.; Tai, C.-W.; Persson, I.; Zou, X.; Backvall, J.-E. Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution of Primary Benzylic Amines Using Pd-0-CalB CLEA as a Biohybrid Catalyst. *Chem.-Eur. J.* **2019**, *25* (39), 9174–9179. <https://doi.org/10.1002/chem.201901418>.
- (293) Li, X.; Fan, Y.; Liao, Q.; Lu, T.; Ge, J. Efficient Enzyme-Metal Hybrid Catalysts Constructed with Polymer. *ChemCatChem* **2023**, *15* (1), e202201319. <https://doi.org/10.1002/cctc.202201319>.
- (294) Li, X.; Cao, Y.; Luo, K.; Sun, Y.; Xiong, J.; Wang, L.; Liu, Z.; Li, J.; Ma, J.; Ge, J.; Xiao, H.; Zare, R. N. Highly Active Enzyme–Metal Nanohybrids Synthesized in Protein–Polymer Conjugates. *Nat. Catal.* **2019**, *2* (8), 718–725. <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0305-8>.
- (295) Wang, Y.; Zhang, N.; Hübner, R.; Tan, D.; Löffler, M.; Facsko, S.; Zhang, E.; Ge, Y.; Qi, Z.; Wu, C. Enzymes Immobilized on Carbon Nitride (C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) Cooperating with Metal Nanoparticles for Cascade Catalysis. *Adv. Mater. Interfaces* **2019**, *6* (6), 1801664. <https://doi.org/10.1002/admi.201801664>.
- (296) Xue, T.; Peng, B.; Xue, M.; Zhong, X.; Chiu, C.-Y.; Yang, S.; Qu, Y.; Ruan, L.; Jiang, S.; Dubin, S.; Kaner, R. B.; Zink, J. I.; Meyerhoff, M. E.; Duan, X.; Huang, Y. Integration of Molecular and Enzymatic Catalysts on Graphene for Biomimetic Generation of Antithrombotic Species. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3200. <https://doi.org/10.1038/ncomms4200>.
- (297) Decarpigny, C.; Bleta, R.; Ponchel, A.; Monflier, E. Oxidation of 2,5-Diformylfuran to 2,5-Furandicarboxylic Acid Catalyzed by Candida Antarctica Lipase B Immobilized in a Cyclodextrin-Templated Mesoporous Silica. The Critical Role of Pore Characteristics on the Catalytic Performance. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2021**, *200*, 111606. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111606>.
- (298) Yang, F.; Rousselot-Pailley, P.; Nicoletti, C.; Simaan, A. J.; Faure, B.; Courvoisier-Dezord, E.; Amouric, A.; Charmasson, Y.; Backov, R.; Tron, T.; Mekmouche, Y. Controlled Immobilization of a Palladium Complex/Laccase Hybrid into a Macrocellular Siliceous Host. *ChemPlusChem* **2023**, *88* (5), e202300156. <https://doi.org/10.1002/cplu.202300156>.

- (299) Budhiraja, M.; Ali, A.; Tyagi, V. Construction of a Bifunctional Pd(0)-CALB@SiO<sub>2</sub> Hybrid Catalyst for the Synthesis and Arylation of Imidazo[1,2-a]Pyridine in One Pot. *European Journal of Organic Chemistry* **2023**, 26 (11), e202201426. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202201426>.
- (300) Gao, J.; Wang, Z.; Guo, R.; Hu, Y.; Dong, X.; Shi, Q.; Sun, Y. Efficient Cascade Conversion of Starch to Gluconic Acid by a Chemoenzymatic System with Co-Immobilized Au Nanoparticles and Enzymes. *Catal. Sci. Technol.* **2023**, 13 (4), 991–999. <https://doi.org/10.1039/D2CY01641A>.
- (301) Smeets, V.; Baaziz, W.; Ersen, O.; M. Gaigneaux, E.; Boissière, C.; Sanchez, C.; P. Debecker, D. Hollow Zeolite Microspheres as a Nest for Enzymes: A New Route to Hybrid Heterogeneous Catalysts. *Chem. Sci.* **2020**, 11 (4), 954–961. <https://doi.org/10.1039/C9SC04615A>.
- (302) Smeets, V.; Baaziz, W.; Ersen, O.; Gaigneaux, E. M.; Boissière, C.; Sanchez, C.; Debecker, D. Hollow Zeolite Microspheres as a Nest for Enzymes: A New Route to Hybrid Heterogeneous Catalysts for Chemo-Enzymatic Cascade Reactions. **2019**. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.7796648.v2>.
- (303) Zhang, N.; Huebner, R.; Wang, Y.; Zhang, E.; Zhou, Y.; Dong, S.; Wu, C. Surface-Functionalized Mesoporous Nanoparticles as Heterogeneous Supports To Transfer Bifunctional Catalysts into Organic Solvents for Tandem Catalysis. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, 1 (11), 6378–6386. <https://doi.org/10.1021/acsanm.8b01572>.
- (304) Zhang, X.; Jing, L.; Chang, F.; Chen, S.; Yang, H.; Yang, Q. Positional Immobilization of Pd Nanoparticles and Enzymes in Hierarchical Yolk-Shell@shell Nanoreactors for Tandem Catalysis. *Chem. Commun.* **2017**, 53 (55), 7780–7783. <https://doi.org/10.1039/C7CC03177G>.
- (305) de Souza, S. P.; Leão, R. A. C.; Bassut, J. F.; Leal, I. C. R.; Wang, S.; Ding, Q.; Li, Y.; Lam, F. L.-Y.; de Souza, R. O. M. A.; Itabaiana Jr, I. New Biosilified Pd-Lipase Hybrid Biocatalysts for Dynamic Resolution of Amines. *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58 (52), 4849–4854. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.11.031>.
- (306) Gustafson, K. P. J.; Lihammar, R.; Verho, O.; Engström, K.; Bäckvall, J.-E. Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution of Primary Amines Using a Recyclable Palladium Nanoparticle Catalyst Together with Lipases. *J. Org. Chem.* **2014**, 79 (9), 3747–3751. <https://doi.org/10.1021/jo500508p>.
- (307) Ganai, A. K.; Shinde, P.; Dhar, B. B.; Gupta, S. S.; Prasad, B. L. V. Development of a Multifunctional Catalyst for a “Relay” Reaction. *RSC Adv.* **2013**, 3 (7), 2186–2191. <https://doi.org/10.1039/C2RA22829G>.
- (308) Vennestrøm, P. N. R.; Taarning, E.; Christensen, C. H.; Pedersen, S.; Grunwaldt, J.-D.; Woodley, J. M. Chemoenzymatic Combination of Glucose Oxidase with Titanium Silicalite-1. *ChemCatChem* **2010**, 2 (8), 943–945. <https://doi.org/10.1002/cctc.201000120>.
- (309) Abednatanzi, S.; Gohari Derakhshandeh, P.; Depauw, H.; Coudert, F.-X.; Vrielinck, H.; Van Der Voort, P.; Leus, K. Mixed-Metal Metal–Organic Frameworks. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, 48 (9), 2535–2565. <https://doi.org/10.1039/C8CS00337H>.
- (310) Eddaoudi, M.; Kim, J.; Rosi, N.; Vodak, D.; Wachter, J.; O’Keeffe, M.; Yaghi, O. M. Systematic Design of Pore Size and Functionality in Isoreticular MOFs and Their Application in Methane Storage. *Science* **2002**, 295 (5554), 469–472. <https://doi.org/10.1126/science.1067208>.
- (311) Karmakar, A.; Pombeiro, A. J. L. Recent Advances in Amide Functionalized Metal Organic Frameworks for Heterogeneous Catalytic Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, 395, 86–129. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.05.022>.
- (312) Bitzer, J.; Kleist, W. Synthetic Strategies and Structural Arrangements of Isoreticular Mixed-Component Metal–Organic Frameworks. *Chemistry – A European Journal* **2019**, 25 (8), 1866–1882. <https://doi.org/10.1002/chem.201803887>.
- (313) Dhakshinamoorthy, A.; Asiri, A. M.; Garcia, H. Mixed-Metal or Mixed-Linker Metal Organic Frameworks as Heterogeneous Catalysts. *Catal. Sci. Technol.* **2016**, 6 (14), 5238–5261. <https://doi.org/10.1039/C6CY00695G>.
- (314) Hemmer, K.; Cokoja, M.; Fischer, R. A. Exploitation of Intrinsic Confinement Effects of MOFs in Catalysis. *ChemCatChem* **2021**, cctc.202001606. <https://doi.org/10.1002/cctc.202001606>.
- (315) Chen, L.; Xu, Q. Metal-Organic Framework Composites for Catalysis. *Matter* **2019**, 1 (1), 57–89. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2019.05.018>.
- (316) Wang, Z.; Wang, R.; Geng, Z.; Luo, X.; Jia, J.; Pang, S.; Fan, X.; Bilal, M.; Cui, J. Enzyme Hybrid Nanoflowers and Enzyme@metal–Organic Frameworks Composites: Fascinating Hybrid Nanobiocatalysts. *Critical Reviews in Biotechnology* **2023**, 1–24. <https://doi.org/10.1080/07388551.2023.2189548>.
- (317) Wang, K.-Y.; Zhang, J.; Hsu, Y.-C.; Lin, H.; Han, Z.; Pang, J.; Yang, Z.; Liang, R.-R.; Shi, W.; Zhou, H.-C. Bioinspired Framework Catalysts: From Enzyme Immobilization to Biomimetic Catalysis. *Chem. Rev.* **2023**, 123 (9), 5347–5420. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00879>.
- (318) Li, Y.; Wang, R.; Liu, X.; Li, K.; Xu, Q. Recent Advances in MOF-Bio-Interface: A Review. *Nanotechnology* **2023**, 34 (20), 202002. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/acbc81>.
- (319) Zou, Z.; Zhou, H.; Dai, L.; Liu, D.; Du, W. A Dual Stable MOF Constructed through Ligand Exchange for Enzyme Immobilization with Improved Performance in Biodiesel Production. *Renewable Energy* **2023**, 208, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.03.072>.
- (320) Zhong, L.-J.; Jiang, B.; Tang, K. Efficient Resolution of 4-Chlormandelic Acid Enantiomers Using Lipase@UiO-67(Zr) Zirconium–Organic Frameworks in Organic Solvent. *Chirality* **2023**, 35 (5), 323–333. <https://doi.org/10.1002/chir.23542>.
- (321) Xu, S.; Qi, X.; Gao, S.; Zhang, Y.; Wang, H.; Liang, Y.; Kong, F.; Wang, R.; Wang, Y.; Yang, S.; An, Y. The Strategy of Cell Extract Based Metal Organic Frameworks (CE-MOF) for Improved Enzyme Characteristics. *Enzyme and Microbial Technology* **2023**, 162, 110134. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110134>.
- (322) Xu, J.; Liu, G.; He, Y.; Zhou, L.; Ma, L.; Liu, Y.; Zheng, X.; Gao, J.; Jiang, Y. Enzyme@bismuth-Ellagic Acid: A Versatile Platform for Enzyme Immobilization with Enhanced Acid-Base Stability. *Front. Chem. Sci. Eng.* **2023**, 17 (6), 784–

794. <https://doi.org/10.1007/s11705-022-2278-4>.
- (323) Wu, G.; Li, M.; Luo, Z.; Qi, L.; Yu, L.; Zhang, S.; Liu, H. Designed Synthesis of Compartmented Bienzyme Biocatalysts Based on Core–Shell Zeolitic Imidazole Framework Nanostructures. *Small* **2023**, *19* (7), 2206606. <https://doi.org/10.1002/smll.202206606>.
- (324) Wang, S.; Wang, J.; Yao, Y.; Liu, J.-Y.; Gao, Y.; Hua, Q.; Jiao, Q.; Liu, J.; Jin, Y.; Zhang, H.; Chen, L. A Mild One-Pot Self-Assembly Approach to Encapsulating Enzymes into Metal–Organic Framework with Asp-Boosted Enzymatic Performance for Clean Production. *Journal of Cleaner Production* **2023**, *401*, 136710. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136710>.
- (325) Suo, H.; Geng, H.; Zhang, L.; Liu, G.; Yan, H.; Cao, R.; Zhu, J.; Hu, Y.; Xu, L. Covalent Immobilization of Lipase on an Ionic Liquid-Functionalized Magnetic Cu-Based Metal–Organic Framework with Boosted Catalytic Performance in Flavor Ester Synthesis. *J. Mater. Chem. B* **2023**, *11* (6), 1302–1311. <https://doi.org/10.1039/D2TB02246J>.
- (326) Sun, G.; Choi, D. M.; Xu, H.; Baek, S. H.; Row, K. H.; Tang, W. Lipase-Based MIL-100(Fe) Biocomposites as Chiral Stationary Phase for High-Efficiency Capillary Electrochromatographic Enantioseparation. *Microchim Acta* **2023**, *190* (3), 84. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05647-9>.
- (327) Pan, Y.; Li, Q.; Liu, W.; Armstrong, Z.; MacRae, A.; Feng, L.; McNeff, C.; Zhao, P.; Li, H.; Yang, Z. Unveiling the Orientation and Dynamics of Enzymes in Unstructured Artificial Compartments of Metal–Organic Frameworks (MOFs). *Nanoscale* **2023**, *15* (6), 2573–2577. <https://doi.org/10.1039/D2NR06659A>.
- (328) Liu, C.; Zhang, X.; Zhou, Y.; Zhu, L.; Zhang, C.; Yan, X.; You, S.; Qi, W.; Su, R. A Reusable and Leakage-Proof Immobilized Laccase@UiO-66-NH<sub>2</sub>(30) for the Efficient Biodegradation of Rifampicin and Lincomycin. *Biochemical Engineering Journal* **2023**, *194*, 108897. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.108897>.
- (329) Li, Y.; Yan, L.; Liu, G.; Chen, H.; Zhao, H.; Wang, L.; Gao, J.; Liu, Y.; Zheng, X.; Jiang, Y. Enhanced Electroenzymatic CO<sub>2</sub> Reduction by a Multifunctional ZIF-8 Layer on Silica Nanoflower with Immobilized Enzyme. *Chemical Engineering Journal* **2023**, *466*, 143198. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.143198>.
- (330) Li, K.-X.; Guan, G.-W.; Pei, L.-M.; Yang, Q.-Y. Constructing a New Platform for Photo-Peroxidase Catalysis: ZIF-90 as a Dual ‘Modulator’ to Overcome Peroxide Industrial Application Bottlenecks. *Mater. Chem. Front.* **2023**. <https://doi.org/10.1039/D2QM01371A>.
- (331) Li, H.; Tu, Y.; Tu, T.; Zhang, Q. Immobilization of Proteases on Nanoflower-Like Metal Organic Framework. *Chinese Journal of Chemistry* **2023**, *41* (12), 1504–1508. <https://doi.org/10.1002/cjoc.202200712>.
- (332) Kesse, X.; Sicard, C.; Steunou, N.; Mahy, J.-P.; Ricoux, R. Encapsulation of Microperoxidase-8 into MIL-101(Cr/Fe) Nanoparticles: A New Biocatalyst for the Epoxidation of Styrene. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2023**. <https://doi.org/10.1002/ejic.202300040>.
- (333) Jiao, R.; Wang, Y.; Pang, Y.; Yang, D.; Li, Z.; Lou, H.; Qiu, X. Construction of Macroporous  $\beta$ -Glucosidase@MOFs by a Metal Competitive Coordination and Oxidation Strategy for Efficient Cellulose Conversion at 120 °C. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15* (6), 8157–8168. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c21383>.
- (334) Ji, Y.; Gao, W.; Sohail, M.; Lin, L.; Zhang, X. Post-Synthesis Modification of Metal–Organic Framework Boosts Solvent-Free Enzymatic Esterifications. *Journal of Catalysis* **2023**, *421*, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2023.03.002>.
- (335) Babaei, H.; Ghobadi Nejad, Z.; Yaghmaei, S.; Farhadi, F. Co-Immobilization of Multi-Enzyme Cascade System into the Metal–Organic Frameworks for the Removal of Bisphenol A. *Chemical Engineering Journal* **2023**, *461*, 142050. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.142050>.
- (336) Giovine, R.; Volklinger, C.; Trébosc, J.; Amoureux, J.-P.; Loiseau, T.; Lafon, O.; Pourpoint, F. NMR Crystallography to Probe the Breathing Effect of the MIL-53(Al) Metal–Organic Framework Using Solid-State NMR Measurements of <sup>13</sup>C–<sup>27</sup>Al Distances. *Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry* **2017**, *73* (3), 176–183. <https://doi.org/10.1107/S2053229616017915>.
- (337) Yuan, S.; Zou, L.; Li, H.; Chen, Y.; Qin, J.; Zhang, Q.; Lu, W.; Hall, M. B.; Zhou, H. Flexible Zirconium Metal–Organic Frameworks as Bioinspired Switchable Catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (36), 10776–10780. <https://doi.org/10.1002/anie.201604313>.
- (338) Chen, Y.; Lykourinou, V.; Vetrovile, C.; Hoang, T.; Ming, L.-J.; Larsen, R. W.; Ma, S. How Can Proteins Enter the Interior of a MOF? Investigation of Cytochrome c Translocation into a MOF Consisting of Mesoporous Cages with Microporous Windows. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (32), 13188–13191. <https://doi.org/10.1021/ja305144x>.
- (339) Burtch, N. C.; Jasuja, H.; Walton, K. S. Water Stability and Adsorption in Metal–Organic Frameworks. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (20), 10575–10612. <https://doi.org/10.1021/cr5002589>.
- (340) Maddigan, N. K.; Linder-Patton, O. M.; Falcaro, P.; Sumby, C. J.; Bell, S. G.; Doonan, C. J. Influence of the Synthesis and Storage Conditions on the Activity of Candida Antarctica Lipase B ZIF-8 Biocomposites. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (44), 51867–51875. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c04785>.
- (341) Liang, W.; Wied, P.; Carraro, F.; Sumby, C. J.; Nidetzky, B.; Tsung, C.-K.; Falcaro, P.; Doonan, C. J. Metal–Organic Framework-Based Enzyme Biocomposites. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (3), 1077–1129. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01029>.
- (342) Liang, K.; Ricco, R.; Doherty, C. M.; Styles, M. J.; Bell, S.; Kirby, N.; Mudie, S.; Haylock, D.; Hill, A. J.; Doonan, C. J.; Falcaro, P. Biomimetic Mineralization of Metal–Organic Frameworks as Protective Coatings for Biomacromolecules. *Nature Communications* **2015**, *6*, 7240. <https://doi.org/10.1038/ncomms8240>.
- (343) Drout, R. J.; Robison, L.; Farha, O. K. Catalytic Applications of Enzymes Encapsulated in Metal–Organic Frameworks. *Coordination Chemistry Reviews* **2019**, *381*, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.11.009>.
- (344) Li, P.; Chen, Q.; Wang, T. C.; Vermeulen, N. A.; Mehdi, B. L.; Dohnalkova, A.; Browning, N. D.; Shen, D.; Anderson,

- R.; Gómez-Gualdrón, D. A.; Cetin, F. M.; Jagiello, J.; Asiri, A. M.; Stoddart, J. F.; Farha, O. K. Hierarchically Engineered Mesoporous Metal-Organic Frameworks toward Cell-Free Immobilized Enzyme Systems. *Chem* **2018**, *4* (5), 1022–1034. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.03.001>.
- (345) Majewski, M. B.; Howarth, A. J.; Li, P.; Wasielewski, M. R.; Hupp, J. T.; Farha, O. K. Enzyme Encapsulation in Metal-Organic Frameworks for Applications in Catalysis. *Crystengcomm* **2017**, *19* (29), 4082–4091. <https://doi.org/10.1039/c7ce00022g>.
- (346) Li, P.; Modica, J. A.; Howarth, A. J.; Vargas L., E.; Moghadam, P. Z.; Snurr, R. Q.; Mrksich, M.; Hupp, J. T.; Farha, O. K. Toward Design Rules for Enzyme Immobilization in Hierarchical Mesoporous Metal-Organic Frameworks. *Chem* **2016**, *1* (1), 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2016.05.001>.
- (347) Gkaniatsou, E.; Serre, C.; Mahy, J.-P.; Steunou, N.; Ricoux, R.; Sicard, C. Enhancing Microperoxidase Activity and Selectivity: Immobilization in Metal-Organic Frameworks. *J. Porphy. Phthalocyanines* **2019**, *23* (7–8), 718–728. <https://doi.org/10.1142/S1088424619300106>.
- (348) Gkaniatsou, E.; Sicard, C.; Ricoux, R.; Benahmed, L.; Bourdreux, F.; Zhang, Q.; Serre, C.; Mahy, J.-P.; Steunou, N. Enzyme Encapsulation in Mesoporous Metal-Organic Frameworks for Selective Biodegradation of Harmful Dye Molecules. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (49), 16141–16146. <https://doi.org/10.1002/anie.201811327>.
- (349) Gkaniatsou, E.; Sicard, C.; Ricoux, R.; Mahy, J.-P.; Steunou, N.; Serre, C. Metal-Organic Frameworks: A Novel Host Platform for Enzymatic Catalysis and Detection. *Mater. Horizons* **2017**, *4* (1), 55–63. <https://doi.org/10.1039/c6mh00312e>.
- (350) Du, Y.; Jia, X.; Zhong, L.; Jiao, Y.; Zhang, Z.; Wang, Z.; Feng, Y.; Bilal, M.; Cui, J.; Jia, S. Metal-Organic Frameworks with Different Dimensionalities: An Ideal Host Platform for Enzyme@MOF Composites. *Coordination Chemistry Reviews* **2022**, *454*, 214327. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214327>.
- (351) Wang, L. J.; Deng, H.; Furukawa, H.; Gándara, F.; Cordova, K. E.; Peri, D.; Yaghi, O. M. Synthesis and Characterization of Metal-Organic Framework-74 Containing 2, 4, 6, 8, and 10 Different Metals. *Inorganic Chemistry* **2014**, *53* (12), 5881–5883. <https://doi.org/10.1021/ic500434a>.
- (352) Yang, Q.; Xu, Q.; Jiang, H.-L. Metal-Organic Frameworks Meet Metal Nanoparticles: Synergistic Effect for Enhanced Catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (15), 4774–4808. <https://doi.org/10.1039/C6CS00724D>.
- (353) Leus, K.; Bogaerts, T.; De Decker, J.; Depauw, H.; Hendrickx, K.; Vrielinck, H.; Van Speybroeck, V.; Van Der Voort, P. Systematic Study of the Chemical and Hydrothermal Stability of Selected “Stable” Metal Organic Frameworks. *Microporous and Mesoporous Materials* **2016**, *226*, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.11.055>.
- (354) Howarth, A. J.; Liu, Y.; Li, P.; Li, Z.; Wang, T. C.; Hupp, J. T.; Farha, O. K. Chemical, Thermal and Mechanical Stabilities of Metal-Organic Frameworks. *Nat Rev Mater* **2016**, *1* (3), 1–15. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2015.18>.
- (355) Park, K. S.; Ni, Z.; Côté, A. P.; Choi, J. Y.; Huang, R.; Uribe-Romo, F. J.; Chae, H. K.; O’Keeffe, M.; Yaghi, O. M. Exceptional Chemical and Thermal Stability of Zeolitic Imidazolate Frameworks. *PNAS* **2006**, *103* (27), 10186–10191. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602439103>.
- (356) Li, P.; Zhu, J.; Zhang, H.; Wang, L.; Wang, S.; Zhang, M.; Wu, J.; Yang, L.; Xu, G. Preparation of Coupling Catalyst HamZIF-90@Pd@CALB with Tunable Hollow Structure for Efficient Dynamic Kinetic Resolution of 1-Phenylethylamine. *Molecules* **2023**, *28* (3), 922. <https://doi.org/10.3390/molecules28030922>.
- (357) Xia, H.; Li, Z.; Zhong, X.; Li, B.; Jiang, Y.; Jiang, Y. HKUST-1 Catalyzed Efficient in Situ Regeneration of NAD<sup>+</sup> for Dehydrogenase Mediated Oxidation. *Chemical Engineering Science* **2019**, *203*, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.03.076>.
- (358) Jing-Yu, L.; Xin-Xin, J.; Jia-Rui, Y.; Xiao-Ping, W.; Jian-Ping, L. A Novel Biosensor of Acetylcholinesterase Immobilized in Metal Organic Framework Based on Gold Nanoflower for Detection of Glyphosate. *Chin. J. Anal. Chem.* **2021**, *49* (11), 1834–1844. <https://doi.org/10.19756/j.issn.0253-3820.211095>.
- (359) Dutta, S.; Kumari, N.; Dubbu, S.; Jang, S. W.; Kumar, A.; Ohtsu, H.; Kim, J.; Cho, S. H.; Kawano, M.; Lee, I. S. Highly Mesoporous Metal-Organic Frameworks as Synergistic Multimodal Catalytic Platforms for Divergent Cascade Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59* (9), 3416–3422. <https://doi.org/10.1002/anie.201916578>.
- (360) Wang, Y.; Zhang, N.; Zhang, E.; Han, Y.; Qi, Z.; Ansorge-Schumacher, M. B.; Ge, Y.; Wu, C. Heterogeneous Metal-Organic-Framework-Based Biohybrid Catalysts for Cascade Reactions in Organic Solvent. *Chem. - Eur. J.* **2019**, *25* (7), 1716–1721. <https://doi.org/10.1002/chem.201805680>.
- (361) Yang, C.; Liu, W.; Chen, S.; Zong, X.; Yuan, P.; Chen, X.; Li, X.; Li, Y.; Xue, W.; Dai, J. MOF-Immobilized Two-in-One Engineered Enzymes Enhancing Activity of Biocatalytic Cascade for Tumor Therapy. *Advanced Healthcare Materials* **2023**, *12* (12), 2203035. <https://doi.org/10.1002/adhm.202203035>.
- (362) Hao, Y.; Deng, S.; Wang, R.; Xia, Q.; Zhang, K.; Wang, X.; Liu, H.; Liu, Y.; Huang, M.; Xie, M. Development of Dual-Enhancer Biocatalyst with Photothermal Property for the Degradation of Cephalosporin. *Journal of Hazardous Materials* **2022**, *429*, 128294. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128294>.
- (363) Yu, J.; Zong, W.; Ding, Y.; Liu, J.; Chen, L.; Zhang, H.; Jiao, Q. Fabrication of ω-Transaminase@Metal-Organic Framework Biocomposites for Efficiently Synthesizing Benzylamines and Pyridylmethylamines. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2022**, *364* (2), 380–390. <https://doi.org/10.1002/adsc.202100997>.
- (364) Winarta, J.; Shan, B.; McIntyre, S. M.; Ye, L.; Wang, C.; Liu, J.; Mu, B. A Decade of UiO-66 Research: A Historic Review of Dynamic Structure, Synthesis Mechanisms, and Characterization Techniques of an Archetypal Metal-Organic Framework. *Crystal Growth & Design* **2020**, *20* (2), 1347–1362. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00955>.
- (365) Romero-Fernández, M.; Paradisi, F. General Overview on Immobilization Techniques of Enzymes for Biocatalysis. In *Catalyst Immobilization*; John Wiley & Sons, Ltd, 2020; pp 409–435. <https://doi.org/10.1002/9783527817290.ch12>.
- (366) Jia, H.; Huang, F.; Gao, Z.; Zhong, C.; Zhou, H.; Jiang, M.; Wei, P. Immobilization of ω-Transaminase by Magnetic

- PVA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *Biotechnology Reports* **2016**, *10*, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.004>.
- (367) Mallin, H.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. Immobilization of (R)- and (S)-Amine Transaminases on Chitosan Support and Their Application for Amine Synthesis Using Isopropylamine as Donor. *Journal of Biotechnology* **2014**, *191*, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.015>.
- (368) Mallin, H.; Menyès, U.; Vorhaben, T.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. Immobilization of Two (R)-Amine Transaminases on an Optimized Chitosan Support for the Enzymatic Synthesis of Optically Pure Amines. *ChemCatChem* **2013**, *5* (2), 588–593.
- (369) Joly, F.; Devaux, P.; Loiseau, T.; Arab, M.; Morel, B.; Volkringer, C. Optimization of the Synthesis of UiO-66(Zr) in Ionic Liquids. *Microporous and Mesoporous Materials* **2019**, *288*, 109564. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.109564>.
- (370) Luan, Y.; Qi, Y.; Gao, H.; Andriamitantoa, R. S.; Zheng, N.; Wang, G. A General Post-Synthetic Modification Approach of Amino-Tagged Metal–Organic Frameworks to Access Efficient Catalysts for the Knoevenagel Condensation Reaction. *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3* (33), 17320–17331. <https://doi.org/10.1039/C5TA00816F>.
- (371) Thuriot-Roukos, J.; Bennis, M.; Heuson, E.; Roussel, P.; Dumeignil, F.; Paul, S. Design of a Multi-Well Plate for High-Throughput Characterization of Heterogeneous Catalysts by XRD, FT-IR, Raman and XRF Spectroscopies. *RSC Advances* **2018**, *8* (71), 40912–40920. <https://doi.org/10.1039/C8RA08216B>.
- (372) Ermer, M.; Mehler, J.; Rosenberger, B.; Fischer, M.; Schulz, P. S.; Hartmann, M. UiO-66 and Hcp UiO-66 Catalysts Synthesized from Ionic Liquids as Linker Precursors. *ChemistryOpen* **2021**, *10* (2), 233–242. <https://doi.org/10.1002/open.202000291>.
- (373) Firth, F. C. N.; Cliffe, M. J.; Vulpe, D.; Aragoñes-Anglada, M.; Moghadam, P. Z.; Fairen-Jimenez, D.; Slater, B.; Grey, C. P. Engineering New Defective Phases of UiO Family Metal–Organic Frameworks with Water. *J. Mater. Chem. A* **2019**, *7* (13), 7459–7469. <https://doi.org/10.1039/C8TA10682G>.
- (374) Hendershot, R. J.; Snively, C. M.; Lauterbach, J. High-Throughput Heterogeneous Catalytic Science. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11* (3), 806–814. <https://doi.org/10.1002/chem.200400613>.
- (375) Goddard, J.; Reymond, J. Enzyme Assays for High-Throughput Screening. *Current Opinion in Biotechnology* **2004**, *15* (4), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.06.008>.
- (376) 9.2: A Novel Integrated High-Throughput Approach for Catalytic Reactions Development: The REALCAT Concept. In *Modern Applications of High Throughput R&D in Heterogeneous Catalysis*; Hagemeyer, A., Volpe, A., Eds.; BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2014; pp 327–340. <https://doi.org/10.2174/9781608058723114010015>.
- (377) Ortega, C.; Otyuskaya, D.; Ras, E.-J.; Virla, L. D.; Patience, G. S.; Dathe, H. Experimental Methods in Chemical Engineering: High Throughput Catalyst Testing - HTCT. *Can. J. Chem. Eng.* **2021**, *99* (6), 1288–1306. <https://doi.org/10.1002/cjce.24089>.
- (378) Isbrandt, E. S.; Sullivan, R. J.; Newman, S. G. High Throughput Strategies for the Discovery and Optimization of Catalytic Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58* (22), 7180–7191. <https://doi.org/10.1002/anie.201812534>.
- (379) Shao, F.; Lee, P.-W.; Li, H.; Hsieh, K.; Wang, T.-H. Emerging Platforms for High-Throughput Enzymatic Bioassays. *Trends Biotechnol.* **2023**, *41* (1), 120–133. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.06.006>.
- (380) Dixit, M.; Panchal, K.; Pandey, D.; Labrou, N. E.; Shukla, P. Robotics for Enzyme Technology: Innovations and Technological Perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **2021**, *105* (10), 4089–4097. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11302-1>.
- (381) Vasina, M.; Vanacek, P.; Damborsky, J.; Prokop, Z. Exploration of Enzyme Diversity: High-Throughput Techniques for Protein Production and Microscale Biochemical Characterization. In *ENZYME ENGINEERING AND EVOLUTION: GENERAL METHODS*; Tawfik, D. S., Ed.; Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd: London, 2020; Vol. 643, pp 51–85. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.05.004>.
- (382) Jacques, P.; Béchet, M.; Bigan, M.; Caly, D.; Chataigné, G.; Coutte, F.; Flahaut, C.; Heuson, E.; Leclère, V.; Lecouturier, D.; Phalip, V.; Ravallec, R.; Dhulster, P.; Froidevaux, R. High-Throughput Strategies for the Discovery and Engineering of Enzymes for Biocatalysis. *Bioprocess Biosyst Eng* **2017**, *40* (2), 161–180. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1690-x>.
- (383) Guram, A.; Hagemeyer, A.; Lugmair, C. G.; Turner, H. W.; Volpe, A. F.; Weinberg, W. H.; Yaccato, K. Application of High Throughput Screening to Heterogeneous Liquid and Gas Phase Oxidation Catalysis. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2004**, *346* (23), 215–230. <https://doi.org/10.1002/adsc.200303170>.
- (384) Stucki, A.; Vallapurackal, J.; Ward, T. R.; Dittrich, P. S. Droplet Microfluidics and Directed Evolution of Enzymes: An Intertwined Journey. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2021**, *60* (46), 24368–24387. <https://doi.org/10.1002/anie.202016154>.
- (385) Hess, D.; Yang, T.; Stavrakis, S. Droplet-Based Optofluidic Systems for Measuring Enzyme Kinetics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412* (14), 3265–3283. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02294-z>.
- (386) Weng, L.; Spoonamore, J. E. Droplet Microfluidics-Enabled High-Throughput Screening for Protein Engineering. *Micromachines* **2019**, *10* (11), 734. <https://doi.org/10.3390/mi10110734>.
- (387) Chiu, F. W. Y.; Stavrakis, S. High-Throughput Droplet-Based Microfluidics for Directed Evolution of Enzymes. *Electrophoresis* **2019**, *40* (21), 2860–2872. <https://doi.org/10.1002/elps.201900222>.
- (388) Zhou, P.; He, J.; Huang, L.; Yu, Z.; Su, Z.; Shi, X.; Zhou, J. Microfluidic High-Throughput Platforms for Discovery of Novel Materials. *Nanomaterials* **2020**, *10* (12), 2514. <https://doi.org/10.3390/nano10122514>.
- (389) Liu, Y.; Hu, Z.; Suo, Z.; Hu, L.; Feng, L.; Gong, X.; Liu, Y.; Zhang, J. High-Throughput Experiments Facilitate Materials Innovation: A Review. *Sci. China Technol. Sci.* **2019**, *62* (4), 521–545. <https://doi.org/10.1007/s11431-018-9369-9>.
- (390) Autour, A.; Ryckelynck, M. Ultrahigh-Throughput Improvement and Discovery of Enzymes Using Droplet-Based

- Microfluidic Screening. *Micromachines* **2017**, *8* (4), 128. <https://doi.org/10.3390/mi8040128>.
- (391) Ras, E.-J.; Rothenberg, G. Heterogeneous Catalyst Discovery Using 21st Century Tools: A Tutorial. *RSC Adv.* **2014**, *4* (12), 5963–5974. <https://doi.org/10.1039/C3RA45852K>.
- (392) Orío, M.; Pantazis, D. A.; Neese, F. Density Functional Theory. *Photosynth. Res.* **2009**, *102* (2–3), 443–453. <https://doi.org/10.1007/s1120-009-9404-8>.
- (393) Morgon, N.; Custodio, R. The Density-Functional Theory. *Quim. Nova* **1995**, *18* (1), 44–55.
- (394) Jacobson, M. P.; Kalyanaraman, C.; Zhao, S.; Tian, B. Leveraging Structure for Enzyme Function Prediction: Methods, Opportunities, and Challenges. *Trends Biochem.Sci.* **2014**, *39* (8), 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.05.006>.
- (395) Vriend, G.; Eijssink, V. Prediction and Analysis of Structure, Stability and Unfolding of Thermolysin-Like Proteases. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1993**, *7* (4), 367–396. <https://doi.org/10.1007/BF02337558>.
- (396) Benner, S. A.; Trabesinger, N.; Schreiber, D. Post-Genomic Science: Converting Primary Structure into Physiological Function. *Advances in Enzyme Regulation* **1998**, *38* (1), 155–180. [https://doi.org/10.1016/S0065-2571\(97\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2571(97)00019-8).
- (397) Mistry, J.; Chuguransky, S.; Williams, L.; Qureshi, M.; Salazar, G. A.; Sonnhammer, E. L. L.; Tosatto, S. C. E.; Paladin, L.; Raj, S.; Richardson, L. J.; Finn, R. D.; Bateman, A. Pfam: The Protein Families Database in 2021. *Nucleic Acids Research* **2021**, *49* (D1), D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>.
- (398) Punta, M.; Coghill, P. C.; Eberhardt, R. Y.; Mistry, J.; Tate, J.; Boursnell, C.; Pang, N.; Forslund, K.; Ceric, G.; Clements, J.; Heger, A.; Holm, L.; Sonnhammer, E. L. L.; Eddy, S. R.; Bateman, A.; Finn, R. D. The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40* (Database issue), D290–D301. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1065>.
- (399) Paysan-Lafosse, T.; Blum, M.; Chuguransky, S.; Grego, T.; Pinto, B. L.; Salazar, G. A.; Bileschi, M. L.; Bork, P.; Bridge, A.; Colwell, L.; Gough, J.; Haft, D. H.; Letunić, I.; Marchler-Bauer, A.; Mi, H.; Natale, D. A.; Orengo, C. A.; Pandurangan, A. P.; Rivoire, C.; Sigrist, C. J. A.; Sillitoe, I.; Thanki, N.; Thomas, P. D.; Tosatto, S. C. E.; Wu, C. H.; Bateman, A. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research* **2023**, *51* (D1), D418–D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>.
- (400) Arimoto, R. Computational Models for Predicting Interactions with Cytochrome P450 Enzyme. *CTMC* **2006**, *6* (15), 1609–1618. <https://doi.org/10.2174/156802606778108951>.
- (401) Hattori, T.; Kito, S.; Murakami, Y. Integration of Catalyst Activity Pattern (INCAP) Artificial Intelligence Approach in Catalyst Design. *Chem. Lett.* **1988**, *17* (8), 1269–1272. <https://doi.org/10.1246/cl.1988.1269>.
- (402) Hattori, T.; Kito, S. Artificial Intelligence Approach to Catalyst Design. *Catalysis Today* **1991**, *10* (2), 213–222. [https://doi.org/10.1016/0920-5861\(91\)80066-I](https://doi.org/10.1016/0920-5861(91)80066-I).
- (403) Kito, S.; Hattori, T.; Murakami, Y. Estimation of the Acid Strength of Mixed Oxides by a Neural Network. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1992**, *31* (3), 979–981. <https://doi.org/10.1021/ie00003a046>.
- (404) Hattori, T.; Kito, S. Neural Network as a Tool for Catalyst Development. *Catalysis Today* **1995**, *23* (4), 347–355. [https://doi.org/10.1016/0920-5861\(94\)00148-U](https://doi.org/10.1016/0920-5861(94)00148-U).
- (405) Yang, W.; Fidelis, T. T.; Sun, W.-H. Machine Learning in Catalysis, From Proposal to Practicing. *ACS Omega* **2020**, *5* (1), 83–88. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03673>.
- (406) Wang, C.; Li, M.; Smola, A. J. Language Models with Transformers. arXiv October 17, 2019. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1904.09408>.
- (407) AlQuraishi, M. AlphaFold at CASP13. *Bioinformatics* **2019**, *35* (22), 4862–4865. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz422>.
- (408) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zeliniski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596* (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- (409) Mariani, V.; Biasini, M.; Barbato, A.; Schwede, T. LDDT: A Local Superposition-Free Score for Comparing Protein Structures and Models Using Distance Difference Tests. *Bioinformatics* **2013**, *29* (21), 2722–2728. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt473>.
- (410) Benner, S. A.; Gerloff, D. Patterns of Divergence in Homologous Proteins as Indicators of Secondary and Tertiary Structure: A Prediction of the Structure of the Catalytic Domain of Protein Kinases. *Advances in Enzyme Regulation* **1991**, *31*, 121–181. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(91\)90012-B](https://doi.org/10.1016/0065-2571(91)90012-B).
- (411) Vaswani, A.; Shazeer, N.; Parmar, N.; Uszkoreit, J.; Jones, L.; Gomez, A. N.; Kaiser, L.; Polosukhin, I. Attention Is All You Need. arXiv July 23, 2023. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1706.03762>.
- (412) Zemla, A. LGA: A Method for Finding 3D Similarities in Protein Structures. *Nucleic Acids Res* **2003**, *31* (13), 3370–3374. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg571>.
- (413) Johnson, L. S.; Eddy, S. R.; Portugaly, E. Hidden Markov Model Speed Heuristic and Iterative HMM Search Procedure. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11* (1), 431. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-431>.
- (414) Remmert, M.; Biegert, A.; Hauser, A.; Söding, J. HHblits: Lightning-Fast Iterative Protein Sequence Searching by HMM-HMM Alignment. *Nat Methods* **2012**, *9* (2), 173–175. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1818>.
- (415) Mirdita, M.; Steinegger, M.; Söding, J. MMseqs2 Desktop and Local Web Server App for Fast, Interactive Sequence Searches. *Bioinformatics* **2019**, *35* (16), 2856–2858. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1057>.
- (416) Steinegger, M.; Söding, J. MMseqs2 Enables Sensitive Protein Sequence Searching for the Analysis of Massive Data Sets. *Nat Biotechnol* **2017**, *35* (11), 1026–1028. <https://doi.org/10.1038/nbt.3988>.
- (417) Mirdita, M.; Schütze, K.; Moriwaki, Y.; Heo, L.; Ovchinnikov, S.; Steinegger, M. ColabFold: Making Protein Folding



Accessible to All. *Nat Methods* **2022**, *19* (6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>.

(418) Evans, R.; O'Neill, M.; Pritzel, A.; Antropova, N.; Senior, A.; Green, T.; Židek, A.; Bates, R.; Blackwell, S.; Yim, J.; Ronneberger, O.; Bodenstein, S.; Zielinski, M.; Bridgland, A.; Potapenko, A.; Cowie, A.; Tunyasuvunakool, K.; Jain, R.; Clancy, E.; Kohli, P.; Jumper, J.; Hassabis, D. Protein Complex Prediction with AlphaFold-Multimer. *bioRxiv* March 10, 2022, p 2021.10.04.463034. <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>.

(419) Hekkelman, M. L.; de Vries, I.; Joosten, R. P.; Perrakis, A. AlphaFill: Enriching AlphaFold Models with Ligands and Cofactors. *Nat Methods* **2023**, *20* (2), 205–213. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01685-y>.

(420) Barton, G. Protein Secondary Structure Prediction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5* (3), 372–376. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(95\)80099-9](https://doi.org/10.1016/0959-440X(95)80099-9).

(421) Muggleton, S.; King, R.; Sternberg, M. Protein Secondary Structure Prediction Using Logic-Based Machine Learning. *Protein Eng.* **1993**, *6* (5), 549–549. <https://doi.org/10.1093/protein/6.5.549>.

(422) Maclin, R.; Shavlik, J. Using Knowledge-Based Neural Networks to Improve Algorithms - Refining the Chou-Fasman Algorithm for Protein-Folding. *Mach. Learn.* **1993**, *11* (2–3), 195–215.

(423) Sternberg, M.; Lewis, R.; King, R.; Muggleton, S. Modeling the Structure and Function of Enzymes by Machine Learning. *Faraday Discuss.* **1992**, *93*, 269–280. <https://doi.org/10.1039/fd9929300269>.

(424) Probst, D.; Manica, M.; Nana Teukam, Y. G.; Castrogiovanni, A.; Paratore, F.; Laino, T. Biocatalysed Synthesis Planning Using Data-Driven Learning. *Nat Commun* **2022**, *13* (1), 964. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28536-w>.

(425) Gligorijević, V.; Renfrew, P. D.; Kosciolk, T.; Leman, J. K.; Berenberg, D.; Vatanen, T.; Chandler, C.; Taylor, B. C.; Fisk, I. M.; Vlamakis, H.; Xavier, R. J.; Knight, R.; Cho, K.; Bonneau, R. Structure-Based Protein Function Prediction Using Graph Convolutional Networks. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 3168. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23303-9>.

(426) Vanacek, P.; Sebestova, E.; Babkova, P.; Bidmanova, S.; Daniel, L.; Dvorak, P.; Stepankova, V.; Chaloupkova, R.; Brezovsky, J.; Prokop, Z.; Damborsky, J. Exploration of Enzyme Diversity by Integrating Bioinformatics with Expression Analysis and Biochemical Characterization. *ACS Catal.* **2018**, *8* (3), 2402–2412. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b03523>.

(427) Bastard, K.; Perret, A.; Mariage, A.; Bessonnet, T.; Pinet-Turpault, A.; Petit, J.-L.; Darii, E.; Bazire, P.; Vergne-Vaxelaire, C.; Brewee, C.; Debard, A.; Pellouin, V.; Besnard-Gonnet, M.; Artiguenave, F.; Médigue, C.; Vallenet, D.; Danchin, A.; Zaparucha, A.; Weissenbach, J.; Salanoubat, M.; de Berardinis, V. Parallel Evolution of Non-Homologous Isofunctional Enzymes in Methionine Biosynthesis. *Nature Chemical Biology* **2017**, *13* (8), 858–866. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2397>.

(428) Mellor, J.; Grigoras, I.; Carbonell, P.; Faulon, J.-L. Semisupervised Gaussian Process for Automated Enzyme Search. *ACS Synthetic Biology* **2016**, *5* (6), 518–528. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00294>.

(429) Bastard, K.; Smith, A. A. T.; Vergne-Vaxelaire, C.; Perret, A.; Zaparucha, A.; De Melo-Minardi, R.; Mariage, A.; Boutard, M.; Debard, A.; Lechaplais, C.; Pelle, C.; Pellouin, V.; Perchat, N.; Petit, J.-L.; Kreimeyer, A.; Medigue, C.; Weissenbach, J.; Artiguenave, F.; De Berardinis, V.; Vallenet, D.; Salanoubat, M. Revealing the Hidden Functional Diversity of an Enzyme Family. *Nature Chemical Biology* **2014**, *10* (1), 42–49. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1387>.

(430) Carbonell, P.; Faulon, J.-L. Molecular Signatures-Based Prediction of Enzyme Promiscuity. *Bioinformatics* **2010**, *26* (16), 2012–2019. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq317>.

(431) Hérisson, J.; Duigou, T.; Du Lac, M.; Bazi-Kabbaj, K.; Sabeti Azad, M.; Buldum, G.; Telle, O.; El Moubayed, Y.; Carbonell, P.; Swainston, N.; Zulkower, V.; Kushwaha, M.; Baldwin, G. S.; Faulon, J.-L. The Automated Galaxy-SynBioCAD Pipeline for Synthetic Biology Design and Engineering. *Nat Commun* **2022**, *13* (1), 5082. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32661-x>.

(432) Xiang, R.; Fernandez-Lopez, L.; Robles-Martín, A.; Ferrer, M.; Guallar, V. EP-Pred: A Machine Learning Tool for Bioprospecting Promiscuous Ester Hydrolases. *Biomolecules* **2022**, *12* (10), 1529. <https://doi.org/10.3390/biom12101529>.

(433) Goldman, S.; Das, R.; Yang, K. K.; Coley, C. W. Machine Learning Molecular Modeling of Family Wide Enzyme-Substrate Specificity Screens. *PLoS Computational Biology* **2022**, *18* (2), e1009853. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009853>.

(434) Ma, E. J.; Siirola, E.; Moore, C.; Kummer, A.; Stoekli, M.; Faller, M.; Bouquet, C.; Eggimann, F.; Ligibel, M.; Huynh, D.; Cutler, G.; Siegrist, L.; Lewis, R. A.; Acker, A.-C.; Freund, E.; Koch, E.; Vogel, M.; Schlingensiefen, H.; Oakeley, E. J.; Snajdrova, R. Machine-Directed Evolution of an Imine Reductase for Activity and Stereoselectivity. *ACS Catal.* **2021**, *11* (20), 12433–12445. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c02786>.

(435) Voutilainen, S.; Heinonen, M.; Andberg, M.; Jokinen, E.; Maaheimo, H.; Pääkkönen, J.; Hakulinen, N.; Rouvinen, J.; Lähdesmäki, H.; Kaski, S.; Rousu, J.; Penttilä, M.; Koivula, A. Substrate Specificity of 2-Deoxy-D-Ribose 5-Phosphate Aldolase (DERA) Assessed by Different Protein Engineering and Machine Learning Methods. *Appl Microbiol Biotechnol* **2020**, *104* (24), 10515–10529. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10960-x>.

(436) Wang, K.; Zhou, R.; Tang, J.; Li, M. GraphscoreDTA: Optimized Graph Neural Network for Protein–Ligand Binding Affinity Prediction. *Bioinformatics* **2023**, *39* (6), btad340. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad340>.

(437) Volkov, M.; Turk, J.-A.; Drizard, N.; Martin, N.; Hoffmann, B.; Gaston-Mathé, Y.; Rognan, D. On the Frustration to Predict Binding Affinities from Protein–Ligand Structures with Deep Neural Networks. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (11), 7946–7958. <https://doi.org/10.1021/acscimedchem.2c00487>.

(438) Faulon, J.-L.; Misra, M.; Martin, S.; Sale, K.; Sapra, R. Genome Scale Enzyme-Metabolite and Drug-Target Interaction Predictions Using the Signature Molecular Descriptor. *Bioinformatics* **2008**, *24* (2), 225–233. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm580>.

(439) Dou, Z.; Sun, Y.; Jiang, X.; Wu, X.; Li, Y.; Gong, B.; Wang, L. Data-Driven Strategies for the Computational Design of Enzyme Thermal Stability: Trends, Perspectives, and Prospects. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2023**, *55* (3), 343–355.

<https://doi.org/10.3724/abbs.2023033>.

- (440) Jia, L.; Sun, T.; Wang, Y.; Shen, Y. A Machine Learning Study on the Thermostability Prediction of (R)- $\omega$ -Selective Amine Transaminase from *Aspergillus Terreus*. *BioMed Research International* **2021**, *2021*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2021/2593748>.
- (441) Hon, J.; Borko, S.; Stourac, J.; Prokop, Z.; Zendulka, J.; Bednar, D.; Martinek, T.; Damborsky, J. EnzymeMiner: Automated Mining of Soluble Enzymes with Diverse Structures, Catalytic Properties and Stabilities. *Nucleic Acids Research* **2020**, *48* (W1), W104–W109. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa372>.
- (442) Gao, X.; Dong, X.; Li, X.; Liu, Z.; Liu, H. Prediction of Disulfide Bond Engineering Sites Using a Machine Learning Method. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 10330. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67230-z>.
- (443) Musil, M.; Konegger, H.; Hon, J.; Bednar, D.; Damborsky, J. Computational Design of Stable and Soluble Biocatalysts. *ACS Catalysis* **2019**, *9* (2), 1033–1054. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b03613>.
- (444) Vasina, M.; Vanacek, P.; Hon, J.; Kovar, D.; Faldynova, H.; Kunka, A.; Buryška, T.; Badenhurst, C. P. S.; Mazurenko, S.; Bednar, D.; Stavrikis, S.; Bornscheuer, U. T.; deMello, A.; Damborsky, J.; Prokop, Z. Advanced Database Mining of Efficient Haloalkane Dehalogenases by Sequence and Structure Bioinformatics and Microfluidics. *Chem Catalysis* **2022**, *2* (10), 2704–2725. <https://doi.org/10.1016/j.checat.2022.09.011>.
- (445) Mazurenko, S.; Prokop, Z.; Damborsky, J. Machine Learning in Enzyme Engineering. *ACS Catalysis* **2020**, *10* (2), 1210–1223. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b04321>.
- (446) Li, F.; Yuan, L.; Lu, H.; Li, G.; Chen, Y.; Engqvist, M. K. M.; Kerkhoven, E. J.; Nielsen, J. Deep Learning-Based Kcat Prediction Enables Improved Enzyme-Constrained Model Reconstruction. *Nat Catal* **2022**, *5* (8), 662–672. <https://doi.org/10.1038/s41929-022-00798-z>.
- (447) Boorla, V. S.; Upadhyay, V.; Maranas, C. D. ML Helps Predict Enzyme Turnover Rates. *Nat Catal* **2022**, *5* (8), 655–657. <https://doi.org/10.1038/s41929-022-00827-x>.
- (448) Chang, A.; Jeske, L.; Ulbrich, S.; Hofmann, J.; Koblitz, J.; Schomburg, I.; Neumann-Schaal, M.; Jahn, D.; Schomburg, D. BRENDA, the ELIXIR Core Data Resource in 2021: New Developments and Updates. *Nucleic Acids Research* **2021**, *49* (D1), D498–D508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1025>.
- (449) Ao, Y.-F.; Pei, S.; Xiang, C.; Menke, M. J.; Shen, L.; Sun, C.; Dörr, M.; Born, S.; Höhne, M.; Bornscheuer, U. T. Structure- and Data-Driven Protein Engineering of Transaminases for Improving Activity and Stereoselectivity. *Angewandte Chemie International Edition* **2023**, *62* (23), e202301660. <https://doi.org/10.1002/anie.202301660>.
- (450) Su, X.; Yang, J.; Yuan, H.; Liu, C.; Tu, R.; Liu, P.; Wang, Q.; Zhu, L. Directed Evolution of Laccase for Improved Thermal Stability Facilitated by Droplet-Based Microfluidic Screening System. *J Agric Food Chem* **2022**, *70* (42), 13700–13708. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05048>.
- (451) Lu, H.; Diaz, D. J.; Czarnecki, N. J.; Zhu, C.; Kim, W.; Shroff, R.; Acosta, D. J.; Alexander, B. R.; Cole, H. O.; Zhang, Y.; Lynd, N. A.; Ellington, A. D.; Alper, H. S. Machine Learning-Aided Engineering of Hydrolases for PET Depolymerization. *Nature* **2022**, *604* (7907), 662–667. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04599-z>.
- (452) Saito, Y.; Oikawa, M.; Sato, T.; Nakazawa, H.; Ito, T.; Kameda, T.; Tsuda, K.; Umetsu, M. Machine-Learning-Guided Library Design Cycle for Directed Evolution of Enzymes: The Effects of Training Data Composition on Sequence Space Exploration. *ACS Catal.* **2021**, *11* (23), 14615–14624. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c03753>.
- (453) Alley, E. C.; Khimulya, G.; Biswas, S.; AlQuraishi, M.; Church, G. M. Unified Rational Protein Engineering with Sequence-Based Deep Representation Learning. *Nat Methods* **2019**, *16* (12), 1315–1322. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0598-1>.
- (454) Krivák, R.; Hoksza, D. P2Rank: Machine Learning Based Tool for Rapid and Accurate Prediction of Ligand Binding Sites from Protein Structure. *Journal of Cheminformatics* **2018**, *10* (1), 39. <https://doi.org/10.1186/s13321-018-0285-8>.
- (455) McNutt, A. T.; Francoeur, P.; Aggarwal, R.; Masuda, T.; Meli, R.; Ragoza, M.; Sunseri, J.; Koes, D. R. GNINA 1.0: Molecular Docking with Deep Learning. *Journal of Cheminformatics* **2021**, *13* (1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13321-021-00522-2>.
- (456) Adasme, M. F.; Linnemann, K. L.; Bolz, S. N.; Kaiser, F.; Salentin, S.; Haupt, V. J.; Schroeder, M. PLIP 2021: Expanding the Scope of the Protein–Ligand Interaction Profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Research* **2021**, *49* (W1), W530–W534. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab294>.
- (457) Liu, Y.; Wang, L.; Liu, M.; Zhang, X.; Oztekin, B.; Ji, S. Spherical Message Passing for 3D Graph Networks. arXiv November 24, 2022. <http://arxiv.org/abs/2102.05013> (accessed 2023-07-04).
- (458) de Souza, P. M.; de Sousa, L. A.; Noronha, F. B.; Wojcieszak, R. Dehydration of Levoglucosan to Levoglucosenone over Solid Acid Catalysts. Tuning the Product Distribution by Changing the Acid Properties of the Catalysts. *Mol. Catal.* **2022**, *529*, 112564. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112564>.
- (459) France, S. P.; Howard, R. M.; Stefflik, J.; Weise, N. J.; Mangas-Sanchez, J.; Montgomery, S. L.; Crook, R.; Kumar, R.; Turner, N. J. Identification of Novel Bacterial Members of the Imine Reductase Enzyme Family That Perform Reductive Amination. *ChemCatChem* **2018**, *10* (3), 510–514. <https://doi.org/10.1002/cctc.201701408>.
- (460) Sharma, M.; Mangas-Sanchez, J.; Turner, N. J.; Grogan, G. NAD(P)H-Dependent Dehydrogenases for the Asymmetric Reductive Amination of Ketones: Structure, Mechanism, Evolution and Application. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359* (12), 2011–2025. <https://doi.org/10.1002/adsc.201700356>.
- (461) Lian, X.; Chen, Y.-P.; Liu, T.-F.; Zhou, H.-C. Coupling Two Enzymes into a Tandem Nanoreactor Utilizing a Hierarchically Structured MOF. *Chemical Science* **2016**, *7* (12), 6969–6973. <https://doi.org/10.1039/C6SC01438K>.
- (462) Feng, D.; Liu, T.-F.; Su, J.; Bosch, M.; Wei, Z.; Wan, W.; Yuan, D.; Chen, Y.-P.; Wang, X.; Wang, K.; Lian, X.; Gu, Z.-Y.; Park, J.; Zou, X.; Zhou, H.-C. Stable Metal–Organic Frameworks Containing Single-Molecule Traps for Enzyme

- Encapsulation. *Nature Communications* **2015**, *6*, 5979. <https://doi.org/10.1038/ncomms6979>.
- (463) Chen, Y.; Lykourinou, V.; Hoang, T.; Ming, L.-J.; Ma, S. Size-Selective Biocatalysis of Myoglobin Immobilized into a Mesoporous Metal–Organic Framework with Hierarchical Pore Sizes. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (17), 9156–9158. <https://doi.org/10.1021/ic301280n>.
- (464) Mandala, V. S.; Hong, M. High-Sensitivity Protein Solid-State NMR Spectroscopy. *Current Opinion in Structural Biology* **2019**, *58*, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.027>.
- (465) Arthanari, H.; Takeuchi, K.; Dubey, A.; Wagner, G. Emerging Solution NMR Methods to Illuminate the Structural and Dynamic Properties of Proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **2019**, *58*, 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.06.005>.
- (466) Guisan, J. M.; López-Gallego, F.; Bolivar, J. M.; Rocha-Martín, J.; Fernandez-Lorente, G. The Science of Enzyme Immobilization. In *Immobilization of Enzymes and Cells*; Guisan, J. M., Bolivar, J. M., López-Gallego, F., Rocha-Martín, J., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2020; Vol. 2100, pp 1–26. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7_1).
- (467) Nandy, A.; Duan, C.; Taylor, M. G.; Liu, F.; Steeves, A. H.; Kulik, H. J. Computational Discovery of Transition-Metal Complexes: From High-Throughput Screening to Machine Learning. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (16), 9927–10000. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00347>.
- (468) Toyao, T.; Maeno, Z.; Takakusagi, S.; Kamachi, T.; Takigawa, I.; Shimizu, K. Machine Learning for Catalysis Informatics: Recent Applications and Prospects. *ACS Catal.* **2020**, *10* (3), 2260–2297. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b04186>.
- (469) McCullough, K.; Williams, T.; Mingle, K.; Jamshidi, P.; Lauterbach, J. High-Throughput Experimentation Meets Artificial Intelligence: A New Pathway to Catalyst Discovery. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22* (20), 11174–11196. <https://doi.org/10.1039/D0CP00972E>.
- (470) Roura Padrosa, D.; Paradisi, F. Bioinformatic Analysis of Immobilized Enzymes: Towards a Better Understanding of the Guiding Forces. *ChemBioChem* **2023**, *n/a* (n/a), e202200723. <https://doi.org/10.1002/cbic.202200723>.
- (471) Roura Padrosa, D.; Marchini, V.; Paradisi, F. CapiPy: Python-Based GUI-Application to Assist in Protein Immobilization. *Bioinformatics* **2021**, *37* (17), 2761–2762. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab030>.
- (472) Ralbovsky, N. M.; Smith, J. P. Machine Learning for Prediction, Classification, and Identification of Immobilized Enzymes for Biocatalysis. *Pharm Res* **2023**. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03457-x>.
- (473) Ralbovsky, N. M.; Smith, J. P. Machine Learning and Chemical Imaging to Elucidate Enzyme Immobilization for Biocatalysis. *Anal Chem* **2021**, *93* (35), 11973–11981. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01909>.
- (474) Chai, M.; Moradi, S.; Erfani, E.; Asadnia, M.; Chen, V.; Razmjou, A. Application of Machine Learning Algorithms to Estimate Enzyme Loading, Immobilization Yield, Activity Retention, and Reusability of Enzyme-Metal-Organic Framework Biocatalysts. *Chem. Mat.* **2021**, *33* (22), 8666–8676. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.1c02476>.
- (475) Lauterbach, S.; Dienhart, H.; Range, J.; Malzacher, S.; Spöring, J.-D.; Rother, D.; Pinto, M. F.; Martins, P.; Lagerman, C. E.; Bommarius, A. S.; Høst, A. V.; Woodley, J. M.; Ngubane, S.; Kudanga, T.; Bergmann, F. T.; Rohwer, J. M.; Iglezakis, D.; Weidemann, A.; Wittig, U.; Kettner, C.; Swainston, N.; Schnell, S.; Pleiss, J. EnzymeML: Seamless Data Flow and Modeling of Enzymatic Data. *Nat Methods* **2023**, *20* (3), 400–402. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01763-1>.
- (476) Range, J.; Halupczok, C.; Lohmann, J.; Swainston, N.; Kettner, C.; Bergmann, F. T.; Weidemann, A.; Wittig, U.; Schnell, S.; Pleiss, J. EnzymeML—a Data Exchange Format for Biocatalysis and Enzymology. *The FEBS Journal* **2022**, *289* (19), 5864–5874. <https://doi.org/10.1111/febs.16318>.
- (477) Pleiss, J. Standardized Data, Scalable Documentation, Sustainable Storage – EnzymeML As A Basis For FAIR Data Management In Biocatalysis. *ChemCatChem* **2021**, *13* (18), 3909–3913. <https://doi.org/10.1002/cctc.202100822>.
- (478) Cailleau, X. *Un wikimédien en résidence mobilisé pour valoriser le patrimoine auvergnat : le témoignage de Nicolas Vignerou*. Wikimédia France. <https://www.wikimedia.fr/un-wikimedien-en-residence-en-auvergne-et-une-premiere-en-france/> (accessed 2023-08-03).



## **Résumé**

Le réchauffement climatique et la prise de conscience écologique oblige aux acteurs de l'industrie chimique à proposer des voies de synthèse plus durables. Une des façons de répondre à cette problématique réside dans l'élaboration de procédés capables d'exploiter les différentes sources de biomasse pour le remplacement des ressources fossiles. Cependant, les premières sont intrinsèquement beaucoup plus complexes à transformer que les dernières, constituées pour la plupart d'une large variété de familles de composés, associés les uns aux autres à travers une diversité encore plus grande de liaisons chimiques. Ces dernières peuvent cependant être rompues de manière sélective, afin de libérer les molécules recherchées, à l'aide de catalyseurs chimiques ou biologiques. Les procédés qui les mettent en jeu doivent, toujours dans une optique de durabilité, être les plus économes possibles en atomes et en énergie. La catalyse hybride, qui consiste en la combinaison de catalyseurs chimiques et biologiques sous la forme de procédé intégrés, tente précisément de répondre à cette problématique. C'est dans le cadre de ce nouveau champ disciplinaire, et plus largement dans celui de la valorisation de la biomasse, que mon activité de recherche s'est inscrite durant ces 7 dernières années. Pour atteindre cet objectif, celle-ci s'est articulée autour de 4 thématiques principales : 1) la recherche de nouvelles enzymes par exploration de la biodiversité, et leur application pour la synthèse de nouveaux composés biosourcés, 2) le développement de stratégies de criblage à haut débit pour la transformation de la biomasse et l'exploitation de souches microbiennes, 3) L'exploration du concept de catalyse hybride, et plus particulièrement le développement de nouveaux matériaux multi-catalytiques, et 4) la conception d'outils informatiques et d'algorithmes en apprentissage machine pour la prédiction de l'activité des catalyseurs. Ces 4 thématiques, et en particulier les 2 dernières, feront l'objet de mon activité de recherche principale pour la suite de ma carrière, alimentées par de nombreuses collaborations, aussi bien avec le monde académique qu'industriel.

## **Abstract**

Global warming and ecological awareness are forcing players in the chemical industry to come up with more sustainable synthesis routes. One way of addressing this issue is to develop processes capable of exploiting different sources of biomass to replace fossil resources. However, the former is intrinsically much more complex to transform than the latter, most of which are made up of a wide variety of families of compounds, associated with each other through an even greater diversity of chemical bonds. However, these bonds can be selectively broken to release the desired molecules, using chemical or biological catalysts. Always with sustainability in mind, the processes that use them must be as atom- and energy-efficient as possible. Hybrid catalysis, which consists of combining chemical and biological catalysts in the form of integrated processes, is one promising the answer to this problem. My research activity over the last 7 years has focused on this new field and, more broadly, on the valorization of biomass. To achieve this objective, my research involved 4 main themes: 1) the search for new enzymes by exploring biodiversity, and their application to the synthesis of new biobased compounds, 2) the development of high-throughput screening strategies for the transformation of biomass and the exploitation of microbial strains, 3) the exploration of the concept of hybrid catalysis, and more particularly the development of new multi-catalytic materials, and 4) the design of computer tools and machine learning algorithms for the prediction of catalyst activity. These 4 themes, and in particular the last 2, will be the focus of my main research activity for the rest of my career, fueled by numerous collaborations with both academia and industry.