

## Les métalloenzymes artificielles : de la biocatalyse à la médecine

**Résumé** Dans le cadre d'une chimie verte, respectueuse de l'environnement, les enzymes artificielles constituent des catalyseurs de choix pour la synthèse de produits d'intérêt pour la chimie fine. Deux exemples phares de travaux sur les métallo-Diels-aldérase artificielles sont présentés dans cet article. Le premier évoque les applications envisagées dans la biocatalyse, et le deuxième ouvre de nouvelles perspectives pour les enzymes artificielles en médecine, notamment par la préparation de métallo- $\beta$ -lactamases artificielles *in vivo*. Une brève revue des complexes biomimétiques des métallo- $\beta$ -lactamases est également présentée. Ces complexes sont une source d'inspiration pour la préparation des métallo- $\beta$ -lactamases artificielles visées. Les modifications des ligands de ces complexes qui sont susceptibles de conduire à de meilleures activités sont décrites en conclusion.

**Mots-clés** Chimie bioinorganique, biomimétisme, métalloenzyme artificielle, cycloaddition de Diels-Alder,  $\beta$ -lactamase.

**Abstract** Artificial metalloenzymes: prospects from biocatalysis to medical applications

In the context of green chemistry, respectful of the environment, artificial enzymes are catalysts of choice for the synthesis of products of interest for fine chemistry. Herein, two key examples of works on artificial metallo-Diels-alderases are presented. The first evokes future applications in biocatalysis, and the second opens up new perspectives for artificial enzymes in medicine, particularly through the preparation of artificial metallo- $\beta$ -lactamases *in vivo*. A brief review of the model complexes of natural metallo- $\beta$ -lactamases follows as these inspire the preparation of the planned artificial metallo- $\beta$ -lactamases. The modifications of the ligands of these complexes that are likely to lead to better activities are described in conclusion.

**Keywords** Bioinorganic chemistry, biomimicry, artificial metalloenzyme, Diels-Alder cycloaddition,  $\beta$ -lactamase.

### Les métalloenzymes artificielles

La biocatalyse alimente l'évolution de la chimie classique vers une chimie verte et durable. Dans le but de multiplier et de diversifier le potentiel des enzymes utilisées en biocatalyse, les chercheurs ont inventé les enzymes artificielles [1]. Ces dernières, provenant soit de protéines ou d'enzymes dont l'activité a été modifiée et/ou redirigée, soit d'enzymes créées *de novo*, sont des outils de choix pour cette nouvelle ère de la chimie car elles peuvent catalyser, dans des conditions écompatibles, des réactions classiques telles que la réaction d'époxydation, la réaction d'addition de Michael, ou encore la réaction emblématique de cyclisation de Diels-Alder (DA).

### Les Diels-aldérase artificielles (DAases)

Le développement des DAases artificielles est particulièrement intéressant car il pourrait combler le manque de DAases naturelles [2]. La réaction de DA modèle sur laquelle se basent les chercheurs pour évaluer les DAases artificielles est la cycloaddition du cyclopentadiène **1** sur la 2-azachalcone **2**. Il a été démontré que, dans l'eau,  $\text{Cu}^{2+}$  était le cation de choix pour catalyser cette réaction car il active la 2-azachalcone **2** en la coordonnant d'une façon bidente, facilitant ensuite l'attaque du cyclopentadiène **1**, et par conséquent la cycloaddition (figure 1). Les propriétés catalytiques de l'enzyme étudiée ( $K_M$  et  $k_{cat}$ ) peuvent être déterminées par un suivi cinétique de la réaction. De plus, les proportions des quatre stéréo-isomères possibles du produit **3** formé sont contrôlées par les résidus protéiques de l'enzyme artificielle et reflètent ainsi sa sélectivité.

Poussés par l'importance des cycloadditions de DA dans la synthèse chimique et par l'impact positif qu'auraient les DAases

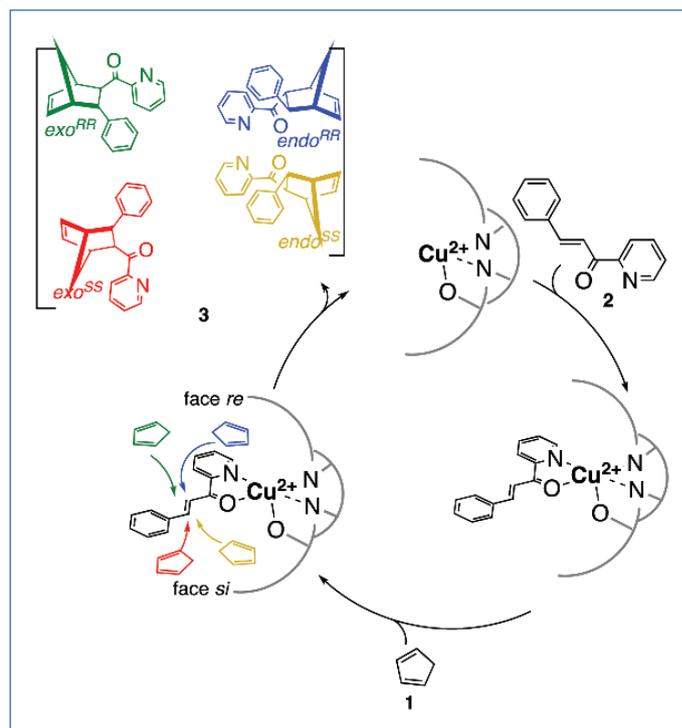


Figure 1 - Mécanisme de la réaction de cycloaddition de Diels-Alder du cyclopentadiène **1** sur la 2-azachalcone **2** catalysée par  $\text{Cu}^{2+}$ .

sur la chimie verte, nous avons préparé une métallo-DAase artificielle en remplaçant par un  $\text{Cu}^{2+}$  le  $\text{Fe}^{2+}$  natif présent au site actif de l'oxydase de l'acide 1-aminocyclopropane carboxylique (ACCO) [3]. En effet, les substrats naturels de l'ACCO, le dioxygène et l'ACC sont de taille comparable à celle de **1** et **2** et, de plus, il est proposé que l'enzyme à  $\text{Fe}^{2+}$

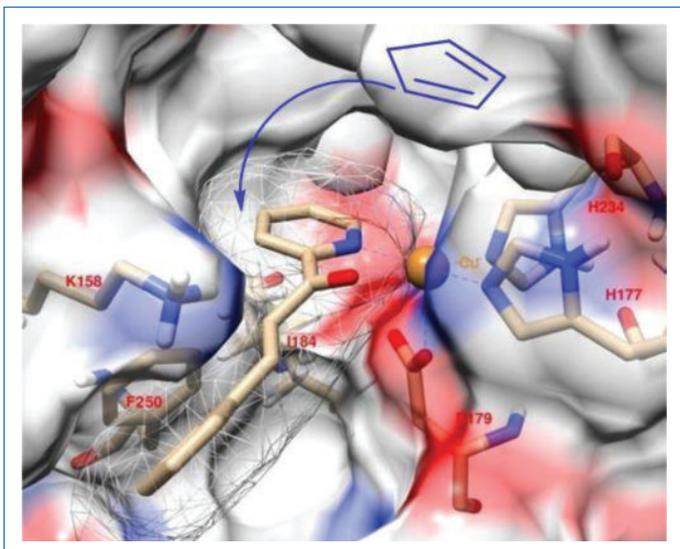


Figure 2 - Modèle obtenu par docking moléculaire montrant le positionnement de la 2-azachalcone **2** au sein de la poche catalytique de l'ACCO-Cu et tracé de la seule voie d'attaque ouverte pour le cyclopentadiène **1**.

coordonne l'ACC d'une façon bidente facilitant ensuite l'attaque de ce substrat par le dioxygène et par conséquent son oxydation. Par la suite, l'enzyme reconstituée avec  $\text{Cu}^{2+}$  (ACCO-Cu) a été utilisée pour catalyser la cycloaddition de DA. ACCO-Cu s'est avérée être une excellente métallo-DAse [4], conduisant spécifiquement et quantitativement à un produit unique, l'*endo*<sup>RR</sup>-**3** (TON > 200) avec un  $k_{\text{cat app}}$  de  $3 \text{ h}^{-1}$ , un  $K_M$  de  $230 \mu\text{M}$  et un  $ee > 99\%$ . Cette spécificité inédite a pu être expliquée grâce aux études de docking moléculaire effectuées. Ces études ont montré qu'une seule géométrie de coordination de la 2-azachalcone **2** dans le site actif était possible, et qu'un seul chemin d'accès au site actif était alors ouvert au cyclopentadiène **1** pour qu'il réagisse avec la 2-azachalcone **2** coordonnée, menant ainsi au seul isomère *endo*<sup>RR</sup>-**3** effectivement observé expérimentalement (figure 2). Comme le prouve cet exemple, l'importance des métallo-enzymes artificielles dans la biocatalyse est aujourd'hui indéniable, et leur utilisation dans d'autres applications peut aussi être envisagée.

### Les métalloenzymes artificielles *in vivo*

Au-delà de l'utilisation des enzymes artificielles pour la biocatalyse, nous avons visé leur utilisation pour l'ingénierie de voies métaboliques abiologiques dans des cellules vivantes. Nous avons ainsi préparé et caractérisé une métalloenzyme artificielle basée sur le récepteur de l'adénosine  $A_{2A}$  intégré dans la membrane cytoplasmique de cellules embryonnaires de rein humain vivantes [5]. Pour assembler cette métalloenzyme artificielle à la surface des cellules, la stratégie dite du « cheval de Troie » a été suivie. Cette stratégie consiste à fixer, grâce à sa haute affinité pour le récepteur, un antagoniste lié de manière covalente au complexe 1,10-phénanthroline de  $\text{Cu}^{2+}$  via un espaceur court ou un espaceur long (**4a-b**, figure 3). L'affinité du récepteur pour les conjugués préparés a ensuite été évaluée par compétition avec un radioligand et des constantes de l'ordre du nanomolaire – similaires à celles de l'antagoniste initial – ont pu être mesurées. Les cellules exprimant le récepteur de l'adénosine  $A_{2A}$  ont également été mises en présence d'un fluorophore lié de manière covalente à un antagoniste de ce récepteur. Les

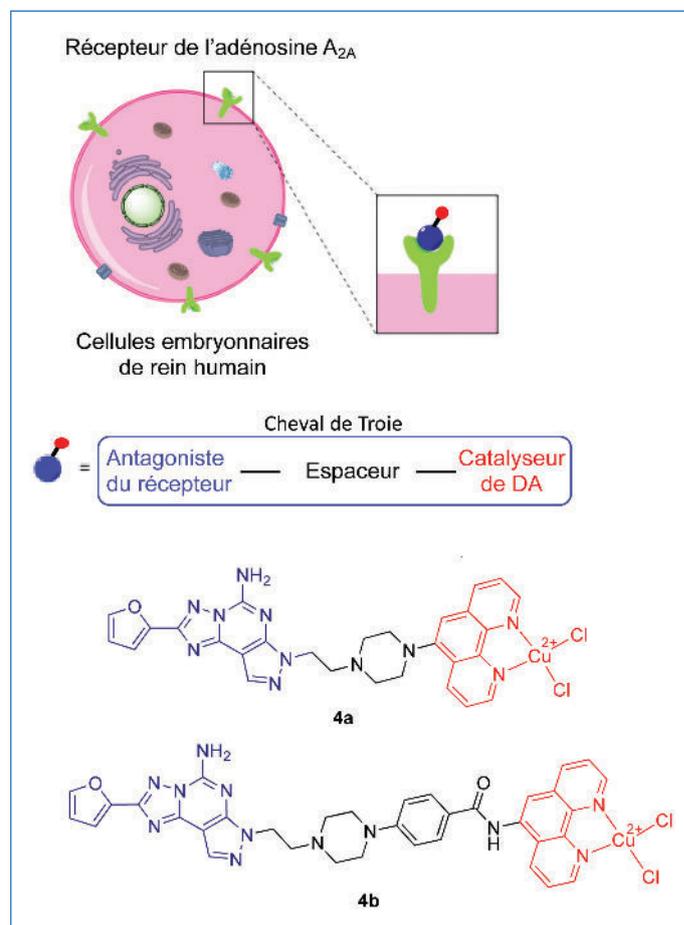


Figure 3 - Métallo-DAses artificielles assemblées à la surface de cellules humaines vivantes par ancrage de conjugués antagoniste-complexe de cuivre dans le récepteur de l'adénosine  $A_{2A}$  exprimé dans la membrane de ces cellules.

images par microscopie de fluorescence montrent que les membranes de ces cellules deviennent fluorescentes contrairement à celles de cellules n'exprimant pas ce récepteur, confirmant la liaison du conjugué fluorophore-antagoniste au récepteur de l'adénosine (figure 4). Le construit s'est montré stable après trois jours à  $4^\circ\text{C}$  indiquant que le temps de résidence des conjugués dans le récepteur était supérieur à trois jours.

L'addition des conjugués **4a-b** aux cellules exprimant le récepteur de l'adénosine  $A_{2A}$  a permis l'assemblage à leur surface des enzymes artificielles qui ont ensuite pu être utilisées pour catalyser la cycloaddition de DA de **1** sur **2**. Les résultats ont révélé qu'aucune sélectivité n'était observée avec le conjugué le plus long (**4b**), suggérant que le complexe de cuivre se trouvait à l'extérieur de la poche de liaison du récepteur. Avec le conjugué le plus court (**4a**), un  $ee$  de 28 % a été observé en faveur du produit *endo*-**3**<sup>RR</sup>, indiquant que, dans ce cas, la métallo-DAse artificielle avait bien été assemblée au niveau du récepteur – le complexe de cuivre se trouvant dans ce cas dans la poche du récepteur – et qu'elle était fonctionnelle, dotant ainsi les cellules vivantes d'une activité abiologique. Ce résultat conceptualise des perspectives médicales pour ces enzymes artificielles. En effet, leur activité pourrait servir pour générer des médicaments ou des sondes pour le diagnostic directement dans l'organisme, et ceci, d'une façon bioorthogonale.

À cet égard, notre stratégie consiste à cibler un récepteur membranaire exprimé spécifiquement à la surface de cellules d'un organe affecté pour le transformer en une enzyme

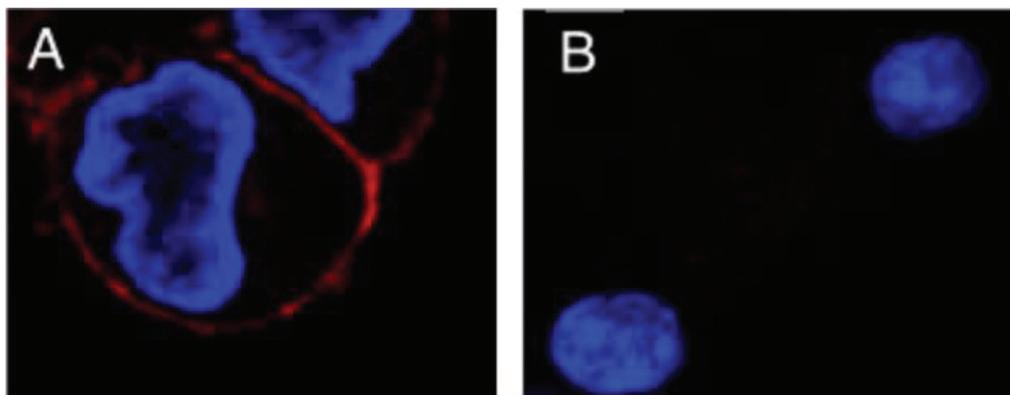


Figure 4 - Microscopie de fluorescence de cellules embryonnaires de rein humain vivantes exprimant (A) et n'exprimant pas (B) le récepteur de l'adénosine A<sub>2A</sub> après incubation avec un colorant du noyau, Hoechst 33342 (bleu), et avec un antagoniste de A<sub>2A</sub> lié de manière covalente au fluorophore BODIPY (rouge).

artificielle capable d'y activer une prodrogue ou prosonde de diagnostic. Les  $\beta$ -lactamines telles que la pénicilline sont des antibiotiques stables dans le corps humain essentiellement parce qu'aucune enzyme humaine capable de catalyser leur hydrolyse n'est connue à ce jour. Ainsi, concevoir un médicament masqué par un  $\beta$ -lactame en une prodrogue, qui ne serait activable que par une enzyme artificielle présentant une activité  $\beta$ -lactamase préparée *in situ* dans l'organe affecté, apparaît comme une piste séduisante pour libérer le médicament spécifiquement au niveau de l'organe visé. Les bactéries résistantes aux  $\beta$ -lactamines possèdent quant à elles des  $\beta$ -lactamases naturelles. Des complexes biomimétiques de ces enzymes liés avec des antagonistes de récepteurs ciblés pourraient donc conduire à l'assemblage de  $\beta$ -lactamases artificielles à la surface des cellules de l'organe affecté. Néanmoins, tous les complexes biomimétiques des  $\beta$ -lactamases connus à ce jour sont peu actifs. Notre premier but est donc d'améliorer l'activité de ces complexes en les modifiant pour mieux mimer les  $\beta$ -lactamases naturelles.

### Les complexes biomimétiques des métallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ L)

L'équipe d'Eiichi Kimura a synthétisé en 1991 le complexe de zinc **1c** comportant un ligand tétradentate apportant une sphère de coordination du métal différente de celle à trois ligands du zinc des M $\beta$ L mononucléaires [6] (figure 5). Ce complexe s'est avéré peu efficace dans la catalyse de l'hydrolyse de la benzylpénicilline **1s** (figure 5), probablement parce que dans ce complexe, Zn<sup>2+</sup> ne possède pas de site de coordination vacant pour se lier au substrat.

L'équipe de Heinrich Vahrenkamp a préparé les complexes de tris(3-arylpirazolyl)borate de zinc **2c** et **3c** [7] (figure 5) et ont montré que ces complexes étaient capables de catalyser l'hydrolyse du monobactame **2s** [8] (figure 5), mais avec une cinétique lente, avec un  $k_{cat}$  de l'ordre d'un tour par minute. Ceci est probablement causé par l'encombrement stérique autour du zinc, qui se retrouve peu accessible au substrat, même si le monobactame **2s** choisi est un  $\beta$ -lactame relativement peu encombrant.

L'équipe de Frank Meyer a synthétisé les complexes dinucléaires de zinc **4c-7c** [9] (figure 5) et a étudié leur activité  $\beta$ -lactamase à l'encontre de la benzylpénicilline **1s** (figure 5). Comme indiqué par les auteurs, la coordination du substrat

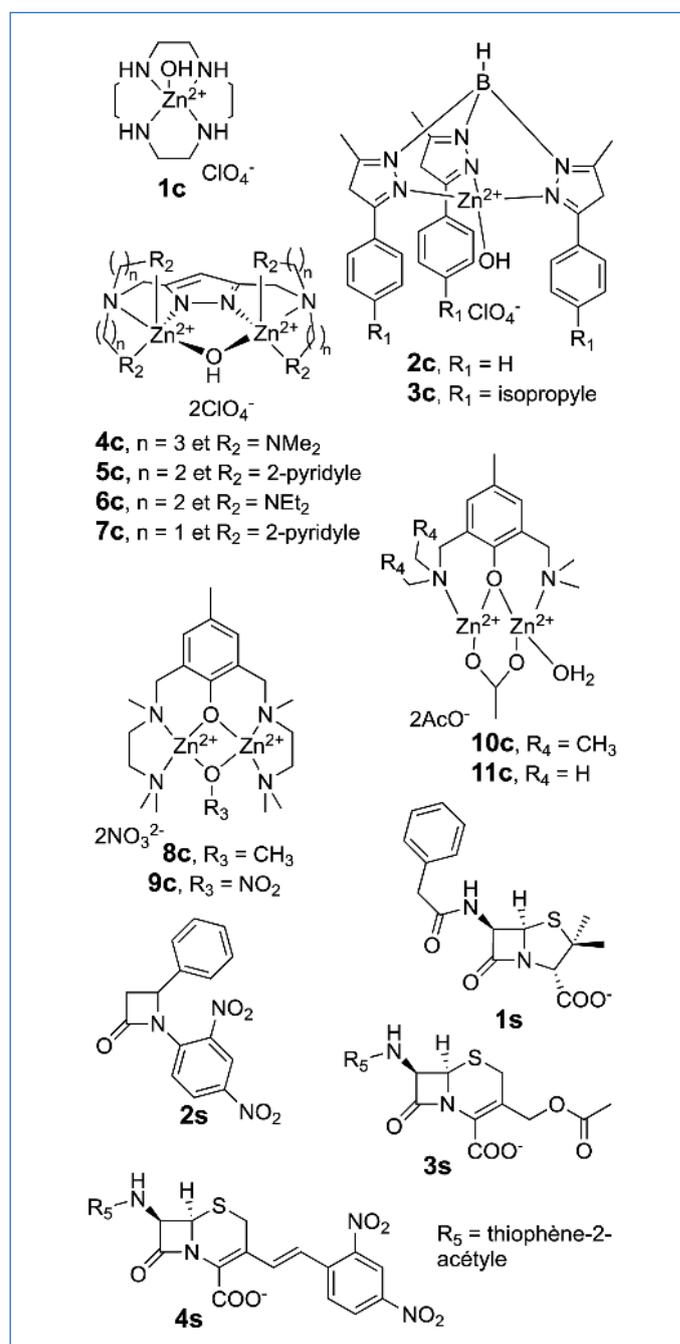


Figure 5 - Complexes mono- et dinucléaires utilisés pour mimer les M $\beta$ L. Les  $\beta$ -lactames **1-4s** sont utilisés comme substrats modèles.

précédant son hydrolyse nécessiterait la décooordination d'un des ligands amine et, de plus, une distance inter-zinc judicieuse serait importante pour rendre cette coordination possible. Les complexes **5c** et **7c** comportant des ligands pyridine n'étaient pas actifs probablement car la pyridine est difficile à décoordonner, ce qui empêche la coordination du substrat. L'analyse des structures cristallines des complexes a permis de mesurer les distances inter-zinc dans chacun des quatre complexes :  $Zn \cdots Zn = 3,61 ; 3,47 ; 4,41$  et  $4,15$  Å respectivement pour les complexes **4c-7c**. L'état de l'art actuel nous permet de comparer ces distances à celles observées dans les nombreuses structures cristallines de MβL dinucléaires. Celles-ci varient entre  $3,10$  et  $3,51$  Å, ce qui suggère que les complexes **4c** et **7c** constituent les meilleurs mimes structuraux de MβL. Le complexe **4c** est effectivement apparu comme le catalyseur le plus actif ; néanmoins la cinétique observée était lente, avec, là-aussi, un  $k_{cat}$  de l'ordre d'un tour par minute.

L'équipe de Stephen Lippard a synthétisé plusieurs complexes dinucléaires de zinc et analysé leurs structures cristallines [10-12]. Les distances inter-zinc  $Zn \cdots Zn = 3,10$  et  $3,29$  Å mesurées respectivement pour les complexes **8c** et **9c** sont comparables à celles retrouvées dans les MβL (figure 5). La fixation de la benzylpénicilline **1s** et celle de la céphalotine **3s** sur ces complexes a aussi été étudiée par spectroscopies RMN  $^{13}C$  et IR. Ces études appuient l'hypothèse selon laquelle les pénicillines et les céphalosporines se lient aux  $Zn^{2+}$  par l'oxygène du groupement carboxylate. Les auteurs ont ensuite étudié les réactions d'hydrolyse de la nitrocéfine **4s** catalysées par ces complexes. Ces réactions se sont avérées jusqu'à 1 000 fois plus rapides que celles catalysées par les complexes précédents. Ces résultats témoignent qu'une distance inter-zinc de  $3,10$  à  $3,51$  Å et qu'une disponibilité d'un site de coordination sur le zinc pour coordonner le substrat sont deux paramètres importants pour l'activité β-lactamase. Plus récemment, l'équipe de Camilla Abbehausen a conçu les complexes **10c** et **11c** composés de ligands tridentates [13] (figure 5). Dans ces complexes, la sphère de coordination des  $Zn^{2+}$  est constituée par les deux atomes d'azote de deux groupements amine et l'oxygène d'un phénolate, et est complétée par des acétates. Ces derniers sont supposés s'échanger dans l'eau avec des ions hydroxyde. La structure cristallographique montre une distance inter-zinc de  $3,12$  Å, mais une faible activité β-lactamase à l'encontre de la nitrocéfine **4s** a cependant été observée. Ces complexes présentent deux sites de coordination vacants par  $Zn^{2+}$ , ce qui pourrait permettre la coordination de plusieurs molécules de substrat sur le complexe, aboutissant ainsi à la décomplexation des cations  $Zn^{2+}$  et à la perte de l'activité.

### Limites des modèles actuels

Les études des complexes mononucléaires (*vide supra*) suggèrent que les MβL mononucléaires sont capables de coordonner le substrat et un ion hydroxyde sur le zinc. Les structures cristallines de MβL mononucléaires suggèrent également la coordination du substrat et montrent que la molécule d'eau réactive engage deux liaisons hydrogène avec un résidu aspartate et un résidu histidine la rendant plus nucléophile, mais sans coordination par le zinc (figure 6A). Les études des complexes mimes des MβL dinucléaires suggèrent quant à elles la coordination du substrat aux deux cations de zinc, et ensuite son attaque par un ion hydroxyde pontant les

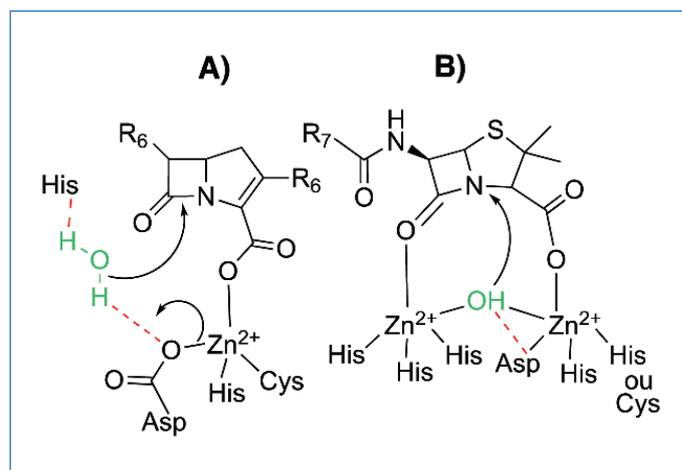


Figure 6 - Site actif de MβL mononucléaires (A) et dinucléaires (B) lié avec un substrat β-lactame.

deux  $Zn^{2+}$ . Les structures cristallines de MβL dinucléaires sont en accord avec ces conclusions, mais suggèrent de plus que l'ion hydroxyde réactif serait aussi lié à un résidu acide aspartique par une liaison hydrogène le rendant encore plus nucléophile (figure 6B).

Il est donc notable que les complexes biomimétiques des MβL sont des complexes fonctionnels qui imitent l'activité hydrolytique de ces enzymes mais négligent des caractéristiques structurales enzymatiques sûrement très importantes pour aboutir à une meilleure activité. En effet, aucun complexe modèle ne comprend un ion hydroxyde rendu plus nucléophile grâce à des liaisons hydrogène avec la deuxième sphère de coordination de  $Zn^{2+}$ , comme observé chez les MβL dinucléaires. La conception de tels complexes est donc nécessaire pour étudier l'impact de ces liaisons hydrogène sur l'activité.

De plus, les sites actifs des MβL dinucléaires comportent des ligands tels que des fonctions imidazole (histidine), thiol (cystéine) et acide carboxylique (acide aspartique) liés aux deux  $Zn^{2+}$  qu'ils maintiennent à une distance inter-zinc de  $3,1$  à  $3,8$  Å. Certains des complexes modèles de ces sites actifs rapportés jusqu'à maintenant miment bien la distance inter-zinc mais comportent majoritairement des ligands azotés avec un seul exemple comportant des ligands oxygénés (*vide supra*). D'autres complexes modèles comportant des ligands variés sont donc nécessaires pour élucider le rôle de la nature du ligand du zinc sur l'activité.

Enfin, des complexes qui à la fois présentent une distance inter-zinc similaire à celles observées dans les MβL, comportent des ligands variés comme observé dans les MβL et sont capables d'activer par liaison hydrogène un ion hydroxyle coordonné aux  $Zn^{2+}$ , permettraient de comprendre l'importance de chacun de ces éléments et de leur combinaison dans l'activité hydrolytique, et aideront par la suite à concevoir de meilleures mimes de MβL qui pourraient enfin servir au développement d'applications thérapeutiques des métalloenzymes artificielles.

La synthèse de complexes de zinc présentant ces caractéristiques constitue un prérequis incontournable pour l'élaboration *in vivo* de métalloenzymes artificielles possédant une activité β-lactamase conséquente et suffisante pour constituer la base de nouveaux outils thérapeutiques basés sur l'hydrolyse de prodrogues et/ou de prosondes possédant un cycle β-lactame.

[1] J. C. Lewis, T.R. Ward *et al.*, Artificial metalloenzymes: reaction scope and optimization strategies, *Chem. Rev.*, **2018**, *118*(1), p. 142-231.

[2] W. Ghattas, J.-P. Mahy, M. Réglie, A.J. Simaan, Artificial enzymes for Diels-Alder reactions, *ChemBioChem*, **2021**, *22*(3), p. 443-459.

[3] W. Ghattas, A.J. Simaan, J.-P. Mahy *et al.*, Cu<sup>II</sup>-containing 1-aminocyclopropane carboxylic acid oxidase is an efficient stereospecific Diels-alderase, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, *58*(41), p. 14605-609.

[4] W. Ghattas, A.J. Simaan, J.-P. Mahy *et al.*, Cu<sup>II</sup>-containing 1-aminocyclopropane carboxylic acid oxidase is an efficient stereospecific Diels-alderase, *Angew. Chem.*, **2019**, *131*(41), p. 14747-751.

[5] W. Ghattas, J.-P. Mahy *et al.*, Receptor-based artificial metalloenzymes on living human cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*(28), p. 8756-62.

[6] T. Koike, M. Takamura, E. Kimura, Role of Zinc(II) in  $\beta$ -lactamase II: a model study with a zinc(II)-macrocyclic tetraamine (1,4,7,10-tetraazacyclododecane, cyclen) complex, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*(19), p. 8443-49.

[7] H. Vahrenkamp, Transitions, transition states, transition state analogues: zinc pyrazolylborate chemistry related to zinc enzymes, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, *32*(7), p. 589-596.

[8] F. Gross, H. Vahrenkamp, Reactions of pyrazolylborate-zinc-hydroxide complexes related to  $\beta$ -lactamase activity, *Inorg. Chem.*, **2005**, *44*(12), p. 4433-40.

[9] B. Bauer-Siebenlist, S. Dechert, F. Meyer, Biomimetic hydrolysis of penicillin G catalyzed by dinuclear zinc(II) complexes: structure-activity correlations in  $\beta$ -lactamase model systems, *Eur. J. Chem.*, **2005**, *11*(18), p. 5343-52.

[10] N.V. Kaminskaia, B. Spingler, S.J. Lippard, Hydrolysis of  $\beta$ -lactam antibiotics catalyzed by dinuclear zinc(II) complexes: functional mimics of metallo- $\beta$ -lactamases, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*(27), p. 6411-22.

[11] N.V. Kaminskaia, C. He, S.J. Lippard, Reactivity of  $\mu$ -hydroxodizinc(II) centers in enzymatic catalysis through model studies, *Inorg. Chem.*, **2000**, *39*(15), p. 3365-73.

[12] N.V. Kaminskaia, B. Spingler, S.J. Lippard, Intermediate in  $\beta$ -lactam hydrolysis catalyzed by a dinuclear zinc(II) complex: relevance to the mechanism of metallo- $\beta$ -lactamase, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*(27), p. 6555-63.

[13] L.G. Ferrarasso, C. Abbehausen *et al.*, Copper(II) and zinc(II) dinuclear enzymes model compounds: the nature of the metal ion in the biological function, *J. Mol. Struct.*, **2017**, *1150*, p. 316-328.

**Morane BEAUMET**, doctorante, **Wadih GHATTAS\***, chargé de recherche au CNRS, et **Jean-Pierre MAHY**, professeur, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO), Université Paris-Saclay.



W. Ghattas

**Wadih GHATTAS a reçu la Médaille de bronze du CNRS en 2021.**

\* wadih.ghattas@universite-paris-saclay.fr




## ERBAdry®: SOLVANTS ANHYDRES "Made in France"

**Bouchons et septa nouvelle génération développés par CARLO ERBA Reagents  
pour des solvants secs plus longtemps et une ergonomie améliorée :**



- 3 larges surfaces de piquage pour faciliter les manipulations
- Inertie chimique assurée par le septum double couche
- Toujours prêt à être refermé grâce au capuchon solidaire du bouchon
- Deux bagues d'inviolabilité : double garantie d'un flacon non ouvert
- Disponible en 100ml et 1l, sans tamis moléculaire

La gamme s'est agrandie !  
 Retrouvez tous les solvants ERBAdry®  
 sur notre site internet :

www.carloerbareagents.com



