



HAL
open science

Etude de résolutions catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde

Hervé Rouillard

► **To cite this version:**

Hervé Rouillard. Etude de résolutions catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde. Autre. Université de La Rochelle, 2012. Français. NNT : 2012LAROS354 . tel-00815983

HAL Id: tel-00815983

<https://theses.hal.science/tel-00815983>

Submitted on 19 Apr 2013

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

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



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE
École Doctorale Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

Laboratoire LIENSs

THÈSE
présentée par :
Hervé ROUILLARD

Soutenue le 30 Janvier 2012
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle
Discipline : Chimie Organique

Etude de résolutions catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde

JURY :

Jean-Pierre BAZUREAU
Jean-René CHEROUVRIER
Lisianne DOMON
Marianne GRABER
Vincent SOL
Valérie THIERY
Giang VO THANH

Professeur, Université Rennes, Rapporteur
Maître de conférences, Université La Rochelle (membre invité)
Maître de conférences, Université La Rochelle
Professeur, Université La Rochelle
Professeur, Université Limoges
Professeur, Université La Rochelle, Directeur de thèse
Professeur, Université Paris-Sud 11, Rapporteur

Remerciements

Remerciements

L'ensemble de ces travaux a été effectué au sein de l'unité mixte de recherche 6250 Littoral, Environnement et Sociétés à l'Université de La Rochelle dans l'équipe Molécules à Activités Biologiques (MAB), sous la direction du Professeur Valérie Thiéry et du Dr Lisianne Domon, maître de conférences. Cette thèse a été financée par une bourse MENRT.

Je tiens à remercier le professeur Syvain Lamare, et le professeur Pierre Richard pour leur accueil au sein du laboratoire LIENSs.

Je remercie chaleureusement le Professeur Valérie Thiéry pour son soutien de tous les instants, de sa patience et sa grande disponibilité qui ont permis l'aboutissement de cette thèse. D'un point de vue plus personnel, je tiens à vous remercier pour votre grande écoute dans les moments les plus difficiles, de votre dynamisme et pour tous vos précieux conseils qui me serviront dans toute ma carrière de chimiste.

Je remercie également le Docteur Lisianne Domon pour ses conseils avisés et son encadrement lors de ces trois années de thèse.

Je remercie chaleureusement les Professeurs Jean-Pierre Bazureau de l'Université de Rennes et Giang Vo Thanh de l'Université de Paris-Sud de m'avoir fait l'honneur d'évaluer et de commenter ce travail en tant que rapporteurs. Je remercie également le Professeur Vincent Sol d'avoir examiné ce travail. Je remercie également le Professeur Marianne Graber pour son aide précieuse en catalyse enzymatique. Je tiens aussi à remercier le Docteur Jean-René Chérouvrier pour son aide durant ses trois années.

Ce travail de thèse fut aussi un grand moment de partage, scientifique ou non avec mes nombreux collègues. Je remercie chaleureusement le Docteur Manu Deau pour son soutien inconditionnel, les cinés, les restos et toutes les passionnantes discussions que nous avons partagées. Je remercie également mon ex-collègue de bureau, le Docteur Hélène Laborie (Dr²) pour son soutien, nos discussions de tout et de rien. Merci pour ton amitié, je te souhaite énormément de bonheur à toi et à Matthieu. Je remercie également Philippe Pineau pour son grand soutien et son amitié.

Remerciements

Je remercie également Régis et Nico J, pour nos instants musicaux et pour leur amitié. Je remercie tous mes collègues docteurs ou doctorant pour tous nos bons moments passés ensemble : Virginie, Nico, les deux Andréas, Yesmine, Zsuzsanna, Guillaume, Mika, Rachida, Oussama, Florian, les amis tunisiens et du LEMMA etc. Et une grande pensée pour Valérie S. (mamacrobio !)

Je remercie également tous les stagiaires ayant contribué à ce travail ou m'ayant soutenu : Pti Nico, Pierre-Emmanuel, Jonathan, Romain, Emilie, Takaya, mes collègues de bureau : Sonia, Marie, Kim, Simon, Lydie et mes étudiants.

Je remercie Vivianne et Laetitia pour le travail administratif effectué et les centaines de bonbons je j'ai pu ingurgiter grâce à vous !

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de mes amis, j'ai une pensée particulière pour Jeremy, Betty, Christine, et tous ceux qui se sont intéressés de près ou de loin à mon travail.

Mes plus profonds remerciements s'adressent à ma famille qui m'a soutenu du début à la fin de cette thèse. Merci à ma mère Marie-France, mon père Jean-Paul, mon frère Olivier et ma sœur Isabelle ; une petite pensée aussi pour le grumeau.

Remerciements

*A mes parents,
A mon frère,
A ma sœur.*

Table des matières	5
Liste des abréviations	11
Introduction générale	13
Chapitre I : Etude bibliographique	15
I. Les enzymes : agents chiraux polyvalents en synthèse organique	16
II. Les lipases : Catalyseurs propres et ubiquitaires	17
1. Généralités	17
2. Réactions réalisables par les lipases	18
3. Règle d'énantiopréférence des lipases	19
4. Calcul de la sélectivité enzymatique	20
5. Structure et mécanisme des lipases	21
6. Influence de la mutation de la lipase	22
7. Mécanisme réactionnel des lipases.....	23
8. Précisions sur la LBCA : Enzyme thermostable	24
1. Origines et isolation	24
2. Panel de réaction utilisable avec la Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	25
3. Immobilisation de la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	25
III. Optimisation des réactions enzymatiques par utilisation du réacteur solide/gaz	27
1. Utilisation d'un enzyme	27
2. Utilisation de micro-organismes	28
IV. Utilisation de lipases sous irradiation micro-onde	30
1. Synthèse et dégradation d'acides/esters gras	32
1. Synthèse de biodiesel	32
2. Valorisation du glycérol et de triglycérides	33
2. Valorisation de l'amidon	36
3. Résolution d'alcools secondaires	37
1. Généralités	37
2. Résolution de divers alcools secondaires sous irradiation micro-onde	38
3. Etude de la résolution du phényléthanol	40
4. Résolution du 1,2,3,4-tétrahydronaphtol.....	44
5. Résolution d'alcools secondaire linéaires	46
6. Optimisation des résolutions par la résolution cinétique séquentielle (SKR)	46
4. Biocatalyse en solvant ionique.....	48
1. Réactions enzymatiques en présence de liquides ioniques sous irradiation micro-onde.....	50
2. Résolution de dérivés amino-phényléthanol	50
3. Estérification de l'acide lactique.....	52
5. Résolution d'amines	53
6. N-acylation	54
7. Calcul des constantes cinétiques	55
1. Influence de l'irradiation micro-onde sur la constante catalytique	55
2. Influence de l'irradiation micro-onde sur la constante de Mickaelis	56
3. Influence de l'irradiation micro-onde sur la dénaturation enzymatique.....	57
8. Limitations	57
1. Transestérification du méthylacétoacétate	58
2. Résolution du butan-2-ol.....	59

9. Application de la catalyse enzymatique sous irradiation micro-onde pour la synthèse de molécules d'intérêt	60
1. Synthèse de dérivés de l'eleuthérine.....	60
2. Résolution du benzotriazol-2-yl-alcan-2-ol.....	62
Objectifs	64
Chapitre II: Influence de l'irradiation sous champ micro-onde sur la stabilité et l'activité de lipases	68
PARTIE I. Etude comparative de la stabilité enzymatique	69
I. Détermination de la stabilité de la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	71
PARTIE II. Détermination d'effets non-thermiques sur l'acétylation du géraniol en chauffage classique et sous irradiation micro-onde par utilisation de la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	73
I. Intérêt biologique de l'acétate de géranyle	74
II. Acétylation du géraniol catalysée par la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	75
1. Comparaison de l'acétylation entre chauffage classique, chauffage sous irradiation micro-onde en système ouvert et fermé	75
2. Comportement de la lipase à plus hautes températures.....	78
3. Mesure de la dégradation enzymatique sous forte température.....	79
PARTIE III. Etude de l'influence de la puissance d'irradiation sur différents exemples de catalyses assistées par des lipases	81
I. Influence de la puissance d'irradiation sur l'acétylation du géraniol	82
II. Influence de la puissance d'irradiation sur la sélectivité de la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	84
1. Influence de la puissance d'irradiation sur l'amidification du mandélate de méthyle	85
2. Etude de la puissance d'irradiation sur l'acétylation du mandélate de méthyle	87
Conclusions	89
Partie Expérimentale	91
(<i>E</i>)-3,7-Dimethyl-octa-2,6-dièn-1-ol ou géraniol (1).....	98
Acétate de (<i>E</i>)-3,7-dimethyl-octa-2,6-diényle ou acétate de géranyle (2).....	99
(<i>S</i>)-Hexan-2-ol (3).....	100
(<i>R</i>)-Propionate de <i>sec</i> hexyle (4).....	101
(<i>R</i>)-Mandélate de méthyle (5a)	102
(<i>S</i>)-Mandélate de méthyle (5b).....	104

<i>(R)</i> - <i>N</i> -Allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (6a).....	105
Chapitre III : Etude comparative de résolutions énantiosélectives d'alcools secondaires sous irradiation micro-onde en présence de lipases	106
PARTIE I. Etude de résolutions d'alcools secondaires linéaires catalysées par la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	107
I. Choix des paramètres réactionnels	108
II. Résolution d'alcools secondaires linéaires sous irradiation micro-onde et chauffage en réacteur solide/gaz	110
1. Comparaison entre chauffage sous irradiation micro-onde et en réacteur solide/gaz.....	111
2. Comparaison de la résolution par augmentation de la taille de la chaîne carbonée.....	111
III. Optimisation des résolutions enzymatiques sous irradiation micro-onde	112
1. Résolution des alcools secondaires linéaires entre 35°C et 95°C.....	112
1. Comparaison des taux de conversion entre 35°C et 95°C.....	113
2. Comparaison des ratios énantiomériques entre 35°C et 95°C.....	114
2. Utilisation de liquides ioniques.....	114
3. Conclusions sur la résolution d'alcools secondaires linéaires.....	116
PARTIE II. Synthèse et résolution d'hydroxyamides chiraux.....	118
PARTIE III. Résolution du mandélate de méthyle biocatalysée par des lipases sous irradiation micro-onde.....	121
I. Le mandélate de méthyle : molécule ubiquitaire en synthèse organique	122
1. Le mandélate de méthyle en tant que précurseur de dérivés γ - et β -lactames.....	122
2. Synthèse et utilisation de cycles γ -lactames.....	123
3. Synthèse de dérivés γ -aminobutyriques.....	124
4. Synthèse de benzoïnes.....	125
5. Synthèse de dérivés hydroxylactones.....	126
II. Synthèse des dérivés mandéliques énantio-purs	128
1. Réduction sélective d'aryldicétones.....	128
2. Oxydation d'aryldiols.....	128
3. Résolution du mandélate de méthyle par hydrolyse énantiosélective.....	129
4. Synthèse du mandélate de méthyle par utilisation de micro-organismes.....	129

PARTIE IV. Etude comparative de la résolution du mandélate de méthyle en chauffage classique et sous irradiation micro-onde par utilisation de lipases	131
I. Résolution du mandélate de méthyle par amidification	132
Choix de l'amine primaire	133
1. Synthèse des étalons α-hydroxyamides chiraux énantiopurs	134
1. Synthèse des α -hydroxyamides énantiopurs par voie chimique	134
2. Synthèse des énantiomères α -hydroxyamides par catalyse enzymatique	135
2. Mesure des pouvoirs rotatoires	136
3. Détermination et optimisation de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse	137
4. Détermination de l'irréversibilité de la réaction	139
5. Etude de l'influence de la température lors de la résolution du mandélate de méthyle sous irradiation micro-onde	139
1. Etude de l'amidification énantiosélective sous irradiation micro-onde en utilisant les lipases de <i>Candida antarctica</i> et de <i>Pseudomonas cepacia</i>	140
2. Etude de l'amidification énantiosélective du mandélate de méthyle par l'étude comparative des solvants	142
3. Etude de la résolution du mandélate de méthyle dans le trifluorotoluène	143
4. Etude de l'amidification du mandélate de méthyle dans le <i>tert</i> -butanol	148
5. Comparaison des taux de conversion et de la sélectivité enzymatique dans le trifluorotoluène et le <i>tert</i> -butanol	150
1. Effet du solvant sur la conversion du mandélate de méthyle	150
2. Effet du solvant sur la sélectivité enzymatique	152
6. Résolution du mandélate de méthyle en fonction du temps de réaction	153
1. Etude de la résolution dans le trifluorotoluène entre 1 et 6 heures	154
2. Etude de la résolution du mandélate de méthyle dans le <i>tert</i> -butanol entre 1 et 6 heures	156
7. Etude de l'ordre d'introduction des substrats	160
8. Résolution du mandélate de méthyle par utilisation d'amines primaires encombrées	163
1. Condensation de la benzylamine sur le mandélate de méthyle	163
2. Condensation de dérivés anilines sur le mandélate de méthyle	164
9. Conclusions sur la résolution du mandélate de méthyle par amidification	166
II. Résolution du mandélate de méthyle par acétylation énantiosélective	166
1. Synthèse des (<i>R</i>) et (<i>S</i>) –<i>O</i>-acétyl mandélate de méthyle énantiopurs	168
1. Synthèse des <i>O</i> -acétyl-mandélate de méthyles (10a) et (10b) par voie chimique	168
2. Synthèse des énantiomères par voie enzymatique	168
2. Acétylation du mandélate de méthyle par utilisation de la lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> sous irradiation micro-onde	170
1. Etude du temps de pré-irradiation optimal	171
2. Acétylation énantiosélective sous haute température	173
III. Application de l'utilisation d'α-hydroxyester chiral à la synthèse de molécules d'intérêts	174
Conclusions sur la résolution du mandélate de méthyle sous irradiation micro-onde	175
Partie Expérimentale	178
(<i>S</i>)-Hexan-2-ol (3)	180

Table des matières

(<i>R</i>)-Propionate de <i>sec</i> hexyle (4).....	181
(<i>S</i>)-Butan-2-ol (8).....	182
(<i>S</i>)-Pentan-2-ol (9).....	183
(<i>R</i>)-Propanoate de <i>sec</i> -butyle (10).....	184
(<i>R</i>)-Propanoate de <i>sec</i> -pentyle (11).....	185
(<i>R</i>)-Mandélate de méthyle (5a).....	190
(<i>S</i>)-Mandélate de méthyle (5b).....	192
(<i>R</i>)- <i>N</i> -Allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (6a).....	193
(<i>S</i>)- <i>N</i> -Allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (6b).....	195
(<i>R</i>)- <i>O</i> -Acétyl mandélate de méthyle (7a).....	196
(<i>S</i>)- <i>O</i> -Acétyl mandélate de méthyle (7b).....	198
(<i>R</i>)- <i>N</i> -Benzyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (12).....	199
(<i>R</i>)-Acide mandélique (13).....	200
(<i>R</i>)- <i>N</i> -Phényl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (14).....	201
Chapitre IV : Etude de la résolution de polyols par des lipases	203
PARTIE I. Synthèse et résolution de dérivés diols cycliques homochiraux	205
I. Aspect bibliographique	206
1. Résolution de diols par catalyse chimique	206
2. Résolution de diols par catalyse enzymatique	207
1. Résolution de diols par hydrolyse énantiosélective.....	208
2. Résolution de dérivés diols par acétylation énantiosélective.....	210
II. Synthèse et résolution de diols cycliques homochiraux pour la synthèse de précurseurs de jasmonate de méthyle	210
1. Résolution de diol homochiraux par voie enzymatique	212
1. Synthèse du (<i>Z</i>)-(<i>1S,8R</i>)-9-oxa-bicyclo[6.1.0]non-4-ène.....	212
2. Hydrolyse du <i>méso</i> -époxyde (15).....	213
3. Acétylation du diol homochiral (16).....	213
2. Etude de la résolution des diols homochiraux par acétylation énantiosélective	214
1. Résolution du diol racémique par acétylation énantiosélective en présence de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> à 35°C.....	214
2. Résolution du diol racémique par acétylation énantiosélective en présence de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> à 50°C.....	216
3. Acétylation du diol homochiral sous irradiation micro-onde.....	217
4. Résolution du diol racémique par acétylation énantiosélective en présence de <i>Pseudomonas cepacia</i>	218
3. Etude de la résolution des diols homochiraux par acétylation énantiosélective	219
1. Résolution des diols par utilisation hydrolyse en utilisant la LBCA.....	219
2. Résolution des diols par utilisation de la lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	221
3. Enrichissement enzymatique du diacétate (<i>1R,2S</i>) (17b).....	222
4. Synthèse des diols (16a) et (16b) énantio purs	222
Conclusion sur la résolution des diols	223

PARTIE II. Les triols : polypropionates complexes issus de la nature	224
I. Aspect bibliographique	224
II. Synthèse et résolution des triols	227
1. Synthèses des dérivés triols	227
1. Synthèse des ester éthyliques de l'acide 3-Hydroxy-2,4-diméthyl-pentanedioïques (19) ...	227
2. Saponification des ester diéthyliques de 3-hydroxy-2,4-diméthyl-pentanedioïques	228
3. Estérification du diacide <i>syn, syn</i> (20a)	229
4. Réduction du diester méthylique <i>syn, syn</i>	229
2. Tentatives de résolution du triol <i>syn, syn</i> par utilisation de la lipase B de <i>Candida antarctica</i> 230	
1. Résolution du triol en chauffage classique	231
2. Résolution du triol <i>syn, syn</i> sous irradiation micro-onde.....	232
3. Synthèse et résolution du triol monoprotégé	233
4. Résolution du triol monoprotégé par la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	234
5. Synthèse et résolution de diacides prochiraux	235
6. Synthèse du diacide <i>syn, syn</i> monoprotégé par saponification.....	235
7. Tentatives de résolution du diacide <i>syn, syn</i> par la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	236
3. Résolution du triol par la cutinase	237
Conclusion	238
Partie Expérimentale	240
(<i>Z</i>)-(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-9-oxa-bicyclo[6.1.0]non-4-ène (15)	240
(±)-(<i>Z</i>)- cyclooct-5-ène-1,2-diol (16).....	241
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-(<i>Z</i>)- Cyclooct-5-ène-1,2-diol (16a)	242
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-(<i>Z</i>)- cyclooct-5-ène-1,2-diol (16b).....	243
(±)-Acétate de (<i>Z</i>)-8-acétoxy-cyclooct-4-ényle (17).....	244
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-diacétate de (<i>Z</i>)-1-acétoxy-cyclooct-4-ényle (17a)	247
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-diacétate de (<i>Z</i>)-1-acétoxy-cyclooct-4-ényle (17b)	248
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-acétate de (<i>Z</i>)-(1 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-8-hydroxy-cyclooct-4-ényle (18a).....	249
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-acétate de (<i>Z</i>)-(1 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-8-hydroxy-cyclooct-4-ényle (18b)	250
Diester éthylique de 3 hydroxy-2,4-diméthyle pentyle (19).....	252
Diacides 3-hydroxy-2,4-diméthyl-pentanoïques (20)	253
Diester méthylique de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-3-Hydroxy-2,4-diméthyl-pentylediméthyl ester (21).....	254
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2,4-Diméthyl-pentane-1,3,5-triol (22)	257
Acétate de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-3,5-dihydroxy-2,4-diméthyl-pentyle (23).....	258
Diacétate de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-3-hydroxy-2,4-diméthyl-pentyle (24)	259
Diacétate de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2,4-diméthyl-3-(<i>tert</i> -butyldiméthylsilyloxy)-glutaryle (25)	260
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2,4-diméthyl-3-(<i>tert</i> -butyldiméthylsilyloxy)-pentan-1,5-diol (26)	261
Acétate de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2,4-diméthyl-3-(<i>tert</i> -butyldiméthylsilyloxy)-pentane-5-diol (27)	262
Acide (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2,4-diméthyl-3-(<i>tert</i> -butyldiméthylsilyloxy)-glutarique (28).....	263
Conclusion Générale	264
Références bibliographiques	269

Liste des abréviations

- °C : Degré Celsius
- $[\alpha]_D$: Pouvoir rotatoire
- δ : Déplacement chimique
- Ac : Acétyle
- AcOH : Acide acétique
- Bn : Benzyle
- c(%) : Conversion en %
- c.c. : Chauffage classique
- CCM : Chromatographie sur couche mince
- $CDCl_3$: Chloroforme deutéré
- COD : Cycloocta-1,5-diène
- CPG : Chromatographie en phase gazeuse
- d* : Doublet
- DCE : 1,2-dichloroéthane
- DCM : Dichlorométhane
- DMSO-*d*₆ : Diméthylsulfoxyde deutéré
- D₂O : Eau deutérée
- E : Ratio énantiomérique
- ee : Excès énantiomérique
- EI : Impact électronique
- EP : Ether de pétrole
- ESI : Electrospray
- Et : Ethyle
- EtOH : Ethanol
- Harom : Proton aromatique
- HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance
- i*-Pr : Isopropyle
- IR : Infrarouge
- LACA : Lipase A de *Candida antarctica*
- LBCA : Lipase B de *Candida antarctica*

Liste des abréviations

L.I.: Liquide ionique

m : Multiplet

m.o. : Micro-onde

MML : *Lipase de Muccor meihei*

Pf : Point de fusion

Ph : Phényle

PPL : Lipase pancréatique de porc

ppm : Partie par million

PS : *Pseudomonas cepacia*

PSL : Lipase de *Pseudomonas cepacia*

Py : Pyridine

RM : *Rhizomucor meihei*

SKR : Résolution dynamique séquentielle

TFT : Trifluorotoluène

TBME : Ether *tert*-butyldiméthyle

Introduction générale

La demande de composés énantiomériquement purs est en forte augmentation dans l'industrie pharmaceutique¹. A titre d'exemple, la vente de médicaments énantiomériquement purs était de 225 milliard d'euros en 2005, représentant 37% du marché de l'industrie pharmaceutique².

La synthèse d'énantiomères peut être réalisée par voie chimique ou enzymatique³. Les voies enzymatiques reposent sur l'utilisation d'enzymes purs ou de préparations d'enzymes immobilisés. L'emploi d'enzymes présente de nombreux avantages : ils sont moins dangereux à manipuler, moins polluants, moins consommateurs d'énergie que les catalyseurs traditionnels à base de métaux comme le ruthénium, le titane ou l'iridium^{4,5}. Les enzymes peuvent aussi être utilisés à température ambiante, ce qui les rend attractifs en terme de coût énergétique.

Parmi ces enzymes, les lipases, des triacylglycérol hydrolases (EC 3.1.1.3) sont capables de catalyser des réactions d'estérification, de transestérification ou d'amidification, avec, dans de nombreux cas, une excellente spécificité énantiomérique.

Les lipases, sont couramment utilisées dans le domaine industriel, du fait de leur sélectivité mais aussi car elles sont respectueuses de l'environnement. Devant l'attrait des industries pour les procédés de chimie verte et la mise en application du règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques (REACH), il existe une forte demande de synthèse de composés stéréochimiquement purs tout en respectant l'environnement⁶.

Pour répondre à cette demande, les chercheurs du laboratoire participent au projet de recherche EXPENANTIO (ANR-08-CP2D) dirigé par le Professeur Marianne Graber. Ce projet ANR vise à combiner étroitement des méthodes expérimentales et théoriques afin de mieux comprendre le contrôle de l'énantiosélectivité des lipases et estérases. Initiée fin 2008, cette étude repose d'une part sur l'étude fondamentale de phénomènes qui sont à l'origine de

¹ Patel R. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews*. **2008**, 252, 659–701.

² Erb S. Single-enantiomer drugs poised for further market growth. *Pharmaceutical Technology*. **2006**, Oct 3.

³ Caprio V., Williams, J. *Catalysis in asymmetric synthesis*. Wiley-Blackwell. Chichester. **2009**.

⁴ Ghanem A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*. **2007**, 63, 1721-1754.

⁵ Govindaraju K., Kiruthiga V., Manikandan R., Ashokkumar T., Singaravelu G. β -glucosidase assisted biosynthesis of gold nanoparticles: A green chemistry approach. *Materials Letters*. **2011**, 65, 256–259.

⁶ Assmuth T., Hildén M., Crayé M. Beyond REACH: Roadblocks and shortcuts en route to integrated risk assessment and management of chemicals. *Science of The Total Environment*. **2010**, 408, 3954-3963.

l'énantiosélectivité des lipases, et d'autre part sur les études expérimentales menées pour valider ces résultats théoriques.

Dans ce projet de recherche une tâche est dédiée à l'irradiation micro-onde et ce, comme moyen d'activation alternatif de réactions sélectives catalysées par des lipases ou estérases afin de mieux appréhender les paramètres intrinsèques de l'enzyme et de permettre la synthèse de synthons chiraux d'intérêt. La synthèse organique sous champs micro-onde est désormais utilisée avec succès depuis de nombreuses années, elle permet notamment de diminuer drastiquement les temps réactionnels.

Dans la littérature, la synthèse enzymatique sous champs micro-onde semble avoir un effet sur l'activité et la stabilité enzymatique, *via* des effets spécifiques, non liés à la température qui sont appelés effets non thermiques^{7,8,9}.

En conséquence, la synthèse organique par utilisation d'enzymes pourrait donc être une alternative viable à la synthèse chimique traditionnelle. Couplée à l'utilisation de micro-onde, elle pourrait permettre une catalyse propre, efficace et rapide, répondant à des critères indispensables pour le chimiste.

⁷ Loupy, A. *Microwaves in organic synthesis*. 2006, Wiley-VCH Verlag Gmbh and Co. KGaA, Weinheim.

⁸ Réjasse B., Lamare S., Legoy M.D., Besson T. Influence of microwave irradiation on enzymatic properties: applications in enzyme chemistry. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2007, 22, 518-526.

⁹ Nuchter M., Muller U., Ondruschka B. Microwave-assisted chemical reactions. *Chemical engineering and technology*. 2003, 26, 1207-1216.

**Chapitre I :
Etude Bibliographique**

I. Les enzymes : agents chiraux polyvalents en synthèse organique

La synthèse de molécules chirales est un véritable challenge pour le chimiste organicien. Afin de permettre l'accès à ces molécules, différentes méthodologies peuvent être employées, comme le dédoublement cinétique enzymatique permettant de séparer les deux énantiomères dans un mélange par modification structurelle de l'un d'entre eux. La résolution enzymatique est une technique simple, verte, hautement sélective qui permet d'aboutir aux deux énantiomères parfaitement séparés¹⁰. Cependant, l'activité et la sélectivité des enzymes sont intimement liées aux paramètres réactionnels appliqués.

Les enzymes sont des protéines de masse molaire élevée, supérieure à 10 000 daltons comportant une poche stéréosélective délimitée spatialement par des acides aminés spécifiques. Cette poche stéréosélective confère à l'enzyme son activité et sa sélectivité. Toute mutation des acides aminés de cette poche ou de son accès par le substrat peut provoquer des changements importants dans l'activité et la sélectivité enzymatique¹¹.

L'utilisation d'enzymes reste néanmoins limitée en synthèse conventionnelle, du fait de leur faible activité et d'une dégradation rapide du catalyseur¹². Pour ces raisons, de nouveaux protocoles ont rapidement permis, en milieux dit non-conventionnels, d'augmenter l'activité et la sélectivité enzymatique.

La synthèse organique à l'aide d'enzymes en solvants organiques a ainsi permis d'améliorer de nombreux paramètres dans les processus de synthèse⁴:

- Meilleurs rendements globaux
- Récupération des produits facilitée du fait d'un faible point d'ébullition des solvants
- Meilleure solubilité des substrats apolaires
- Contamination bactérienne négligeable
- Hydrolyse défavorisée
- Limitation de la dénaturation enzymatique
- Récupération de l'enzyme aisée par simple filtration, sans sel de phosphates

¹⁰ Zhu D., Mukherjee C., Hua L. "Green" synthesis of important pharmaceutical building blocks: enzymatic access to enantiomerically pure α -chloroalcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2005**, 16, 3275–3278.

¹¹ Syrén P.O., Lindgren E., Hoeffken H.W., Branneby C., Maurer S., Hauer B., Hult K. Increased activity of enzymatic transacylation of acrylates through rational design of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 65, 3–10.

¹² Padma V., Iyer P.V., Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*. **2008**, 43, 1019–1032.

Parmi les différents enzymes utilisables en synthèse chimique, les lipases sont très souvent utilisées pour la synthèse et/ou la résolution de composés précurseurs utiles au chimiste organicien ¹³.

II. Les lipases : Catalyseurs propres et ubiquitaires

1. Généralités

Les lipases (triacyl glycérol hydrolases EC : 3.1.1.3) sont des sérines hydrolases atypiques qui sont retrouvées aussi bien chez les végétaux, animaux ¹⁴, bactéries Gram+ ¹⁵ ou Gram - ¹⁶, et chez les mycètes ¹⁷. Nativement utilisées dans la régulation du métabolisme des triglycérides et lipoprotéines ¹⁸, ces sérines hydrolases permettent notamment la dégradation des triglycérides pour le passage à travers la barrière intestinale chez les vertébrés.

Du fait de leur utilisation métabolique dans l'hydrolyse des esters gras, beaucoup d'entre elles agissent en interface eau/ester gras, au biais d'un volet amphiphile, boucle peptidique permettant l'accès des substrats dans le site actif, ce dernier influençant la sélectivité de l'enzyme ¹⁹.

¹³ Wong C.H., Whitesides G.M. Enzymes in Organic Chemistry. Tetrahedron Organic Chemistry volume 12. **1994**, Pergamon, Oxford.

¹⁴ Cherif S., Gargouri Y. Thermoactivity and effects of organic solvents on digestive lipase from hepatopancreas of the green crab. *Food Chemistry*. **2009**, 116, 82–86.

¹⁵ Guncheva M., Zhiryakova D. Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2011**, 68, 1–21.

¹⁶ Gaur R., Gupta A., Khare S.K. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochemistry*. **2008**, 43, 1040–1046.

¹⁷ Fu D., Yu M., Tan T., Zhou X. Separation, characterization and catalytic properties of Lip2 isoforms from *Candida sp.* 99-125. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2009**, 56, 115–121.

¹⁸ Holmes R., VandeBerg J., Cox L. Comparative studies of vertebrate lipoprotein lipase: A key enzyme of very low density lipoprotein metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **2011**, 6, 224–234.

¹⁹ Overbeeke P., Govardhan C., Khalaf N., Jongejan J., Heijnen J. Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2000**, 10, 385–393.

2. Réactions réalisables par les lipases

Les lipases peuvent être employées en synthèse organique en tant que catalyseurs de choix. En effet, elles présentent l'avantage de réaliser une multitude de réactions chimiques, allant de l'estérification (1)²⁰, à l'acidolyse (2)²¹, en passant par l'amidification (3)²², l'hydrolyse (4)²³ ou la transestérification (5)²⁴ (Schéma 1). En fonction du micro-environnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique.

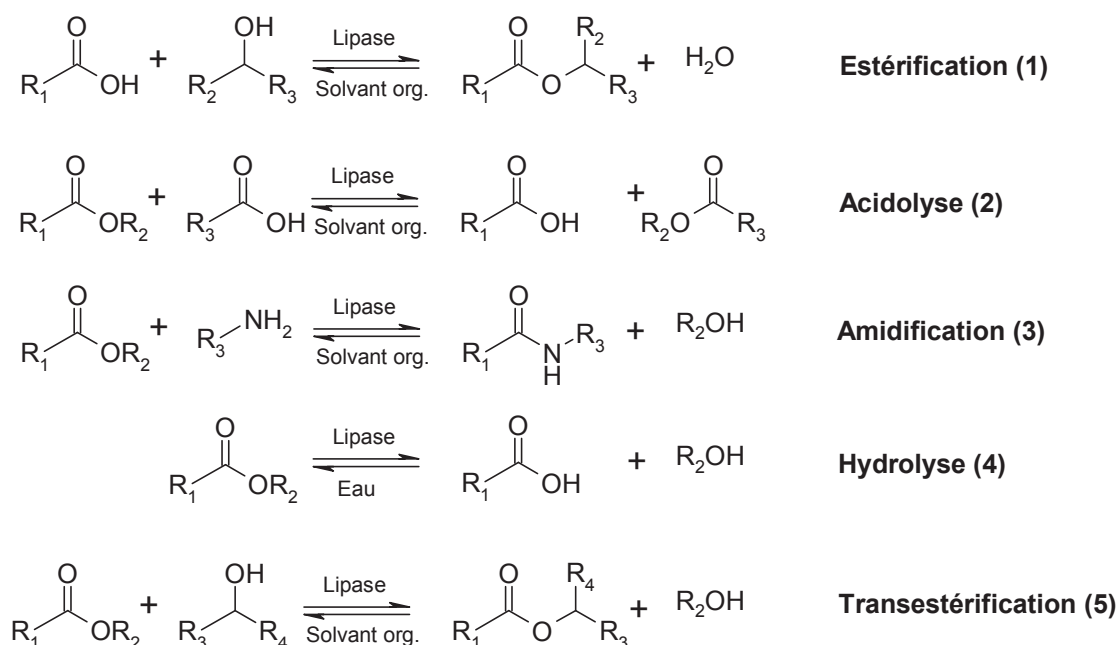


Schéma 1 : Différentes réactions possibles par utilisation de lipases

Les lipases offrent tout un panel de réactions possibles, directement utilisables en synthèse organique.

²⁰ Vidya P., Chadha A. *Pseudomonas cepacia* lipase catalyzed esterification and transesterification of 3-(furan-2-yl) propanoic acid/ethyl ester: A comparison in ionic liquids vs hexane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 65, 68–72.

²¹ Foresti M.L., Ferreira M.L. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses.. *Enzyme and Microbial Technology*. **2010**, 46, 419–429.

²² Prasad A., Husain M., Singh B., Gupta R., Manchanda V., Olsen C., Parmar V. Solvent-free biocatalytic amidation of carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*. **2005**, 46, 4511-4514.

²³ Zhang Y., Liu J. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (R,S)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. *Biochemical Engineering Journal*. **2011**, 54, 40–46.

²⁴ Singh M., Singh S., Singh R.S., Chisti Y., Banerjee U. Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 2116-2120.

3. Règle d'énantiopréférence des lipases

La reconnaissance moléculaire entre l'enzyme et les énantiomères a été, dès les années 90, identifiée comme un paramètre clé responsable de leur énantiosélectivité. Le premier modèle prédictif a été proposé par l'équipe de Kazlauskas²⁵. De nature empirique, ce modèle repose sur le criblage systématique de nombreux alcools secondaires et il a permis d'établir que l'énantiopréférence est corrélée à la différence de taille entre les deux substituants de l'alcool secondaire et à leur positionnement distinct dans les poches du site actif des lipases de *Burkholderia cepacia* et de *Candida rugosa*²⁶.

Lors de réactions de résolution énantiosélective, Kazlauskas a démontré que la stabilisation du substrat de configuration (*R*) est favorisée dans le site actif, pour des raisons stériques (Figure 1).

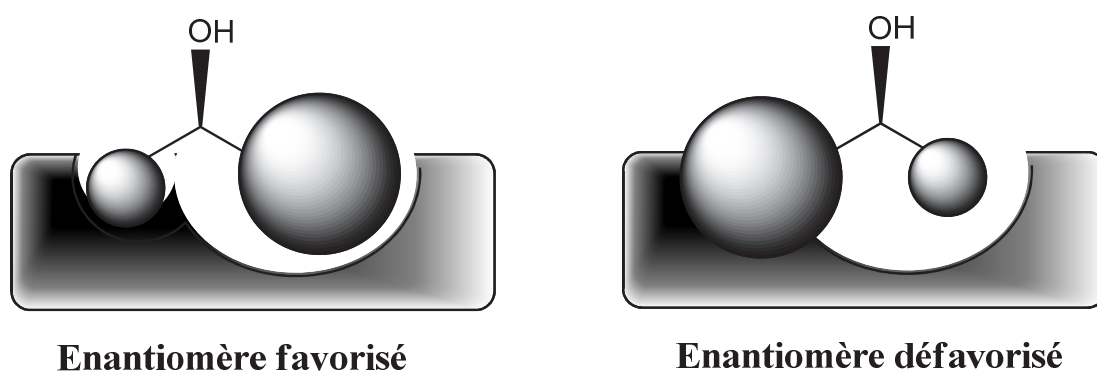


Figure 1 : Positionnement idéal de l'alcool secondaire dans le site actif de l'enzyme (M représente le substituant de taille moyenne et L de substituant le plus encombré)

Lors du positionnement idéal du substrat dans l'enzyme, l'énantiomère le plus favorisé (ici à gauche) a son substituant le plus encombré (noté L) dans la poche large de l'enzyme, alors que le substituant moyen (noté M) est dans la poche stéréospécifique de l'enzyme. Cette configuration induit une catalyse enzymatique optimale. Dans le cas où l'autre énantiomère avec le substituant le moins encombré dans la poche large, pénètre dans le site actif de l'enzyme, la catalyse est défavorisée. Les substituants, par des interactions stériques défavorables sont moins stables dans le site actif. Cet énantiomère sera faiblement catalysé.

²⁵ Janes L.E., Kazlauskas R.J. Empirical rules for the enantioselectivity of lipase from *Aspergillus niger* toward secondary alcohols and carboxylic acids, especially α -amino acids. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1997**, 8, 3719-3733.

²⁶ Lafaquière V. Compréhension et prédiction de l'énantiosélectivité des lipases. Thèse de Doctorat à l'INSA de Toulouse. **2010**, 48-51.

4. Calcul de la sélectivité enzymatique

La sélectivité enzymatique peut être quantifiée par un paramètre appelé ratio énantiomérique noté E. Il correspond au rapport des constantes cinétiques de l'enzyme pour le substrat majoritairement biocatalysé, en fonction du minoritaire (Equation 1).

$$E = \frac{K_{cat}(R) * K_M(R)}{K_{cat}(S) * K_M(S)}$$

Équation 1 : Calcul du ratio énantiomérique en utilisant les constantes cinétiques

K_{cat} , la constante catalytique est un facteur de la fréquence réactionnelle, traduisant le nombre de molécule catalysé par seconde. K_m , la constante de Mickaelis exprimée en concentration molaire traduit l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Expérimentalement, le ratio énantiomérique est difficile à calculer car seules des molécules énantiopures doivent être utilisées. De plus, les deux substrats doivent être catalysés par l'enzyme, ce qui pose des problèmes en cas de non-utilisation de l'un des deux énantiomères.

Pour pallier ce problème, il est possible de déterminer E à partir des paramètres simples comme la conversion enzymatique (ici notée c), l'excès énantiomérique de substrat (ee_s), l'excès énantiomérique de produit (ee_p). Ces calculs ne sont cependant utilisables que pour des réactions irréversibles (Equation 2) ²⁷.

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1+ee_s)]}{\ln[(1-c)(1-ee_s)]} : \text{Pour le substrat}$$

$$E = \frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]} : \text{Pour le produit}$$

$$E = \frac{\ln[(1-ee_s)(1+ee_s/ee_p)]}{\ln[(1+ee_s)/(1+ees/ee_p)]} : \text{Pour le substrat et le produit.}$$

Équation 2 : Calcul du ratio énantiomérique en faisant intervenir le taux de conversion (c), et les excès énantiomériques de substrat (ee_s) et de produit (ee_p)

²⁷ Chen C., Fujimoto Y., Girdaukas G., Sih C. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *Journal of the American Chemical Society*. **1982**. 104, 7294-7299.

5. Structure et mécanisme des lipases

La structure tridimensionnelle des lipases ainsi que leur mécanisme réactionnel sont depuis longtemps source d'études^{28,29}. A titre d'exemple, la lipase B de *Candida antarctica*, une protéine de 33kDa, constituée de 317 acides aminés, se caractérise, comme chez les estérases, par la présence d'une structure α/β (Figure 2).

Le site actif de l'enzyme est constitué d'une triade catalytique composée de :

- la serine 105, agissant comme nucléophile lors de la formation du premier intermédiaire tétraédrique
- de l'histidine 224
- l'acide aspartique 187 qui stabilise ce dernier (Schéma 4 p.24)

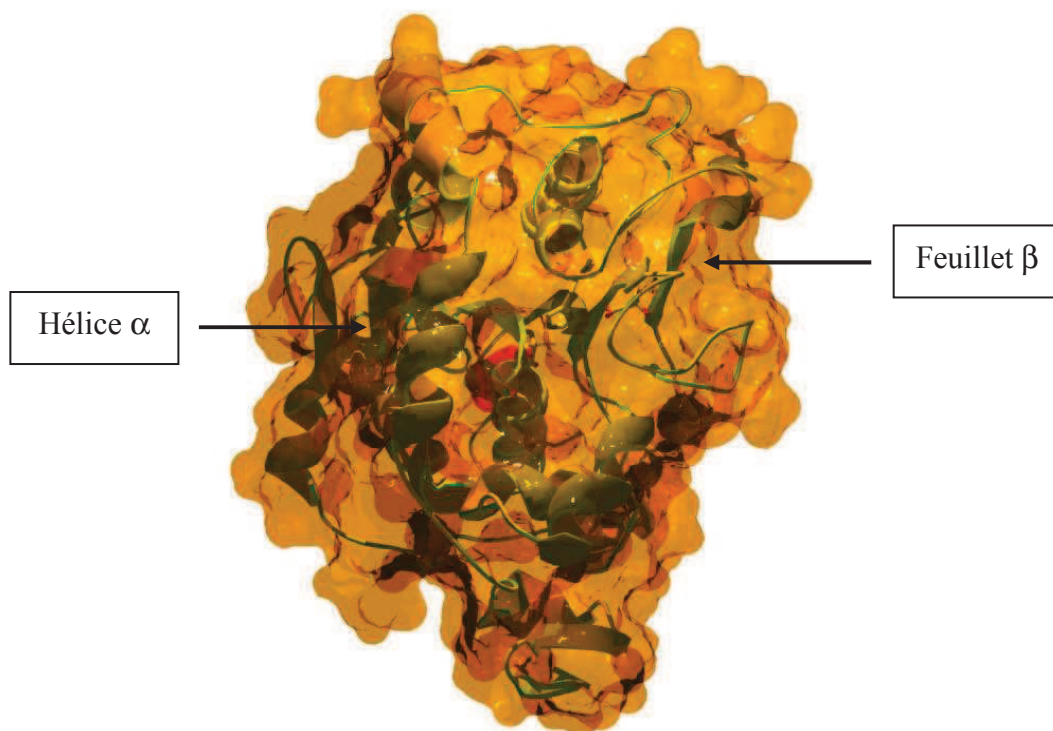


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de la lipase B de *Candida antarctica*

²⁸ De Oliveira E., Humeau C., Chebil L., Maia E., Dehez F., Maigret B., Ghoul M., Engasser J.-M. Molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, 59, 96–105.

²⁹ Xu T., Gao B., Zhang L., Lin J., Wang X., Wei D. Template-based modeling of a psychrophilic lipase: Conformational changes, novel structural features and its application in predicting the enantioselectivity of lipase catalyzed transesterification of secondary alcohols. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2010**, 1804, 2183–2190.

L'activité et la sélectivité enzymatique sont dépendantes des acides aminés qui constituent la poche stéréosélective de l'enzyme ou encore l'accès au site actif.

6. Influence de la mutation de la lipase

La mutation de certains acides aminés clés d'une lipase peut conduire à un changement de l'énantiopréférence^{30,31}.

Au laboratoire, Marton *et al.* ont étudié la résolution du pentan-2-ol par le propanoate de vinyle. La réaction a été réalisée en présence de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur Chromosorb P, un support silicié et sur l'enzyme muté au niveau de sa poche stéréospécifique, au niveau de la sérine 47 et de la thréonine 42 (Schéma 2)^{32,33}.

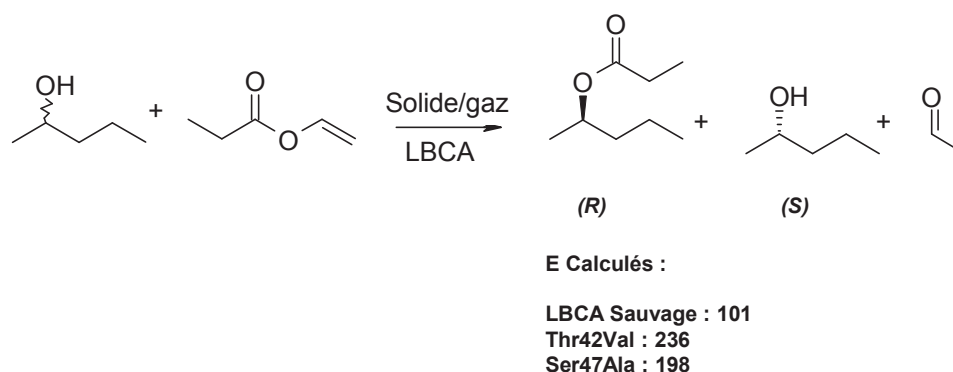


Schéma 2 : Résolution du pentan-2-ol par la lipase B de *Candida antarctica* de type sauvage ou de type mutants

La mutation de la thréonine 42 ou de la sérine 47 par des acides aminés structurellement proches moins polaires, comme la valine et l'alanine, provoque une forte augmentation de l'énantiosélectivité de la lipase B de *Candida antarctica*, comparé à la lipase sauvage. Le facteur E passe de 101 à 236 lors de la mutation de la thréonine 42 et à 198 lors de la mutation de la sérine 47. Une étude de modélisation moléculaire a montré que cette

³⁰ Svedendahl M., Hult K., Berglund P. Fast Carbon–Carbon Bond Formation by a Promiscuous Lipase. *Journal of the American Chemical Society*. **2005**, 127, 17988-17999.

³¹ Syrén P.O., Lindgren E., Hoeffken H.W., Branneby C., Maurer S., Hauer B., Hult K. Increased activity of enzymatic transacylation of acrylates through rational design of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 65, 3-10.

³² Marton Z., Léonard-Nevers V., Syrén P.O., Bauer C., Lamare S., Hult K., Tran V., Graber M. Mutations in the stereospecificity pocket and at the entrance of the active site of *Candida antarctica* lipase B enhancing enzyme enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 65, 11–17.

³³ O. Magnusson A.O., Takwa M., Hamberg A., Hult K. An S-Selective Lipase Was Created by Rational Redesign and the Enantioselectivity Increased with Temperature. *Angewandte Chemie International Edition*. **2005**, 117, 4658-4661.

augmentation de sélectivité peut être expliquée par un changement du réseau de liaison hydrogène qui provoquent une augmentation de la mobilité des acides aminés de la poche stéréospécifique de la lipase.

7. Mécanisme réactionnel des lipases

Le mécanisme réactionnel des réactions enzymatiques est commun à toutes les sérines hydrolases. Prenons l'exemple général d'une transestérification³⁴ (Schéma 3 et 4).

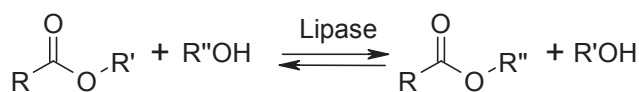


Schéma 3 : Transestérification catalysée par une lipase
Enzyme native

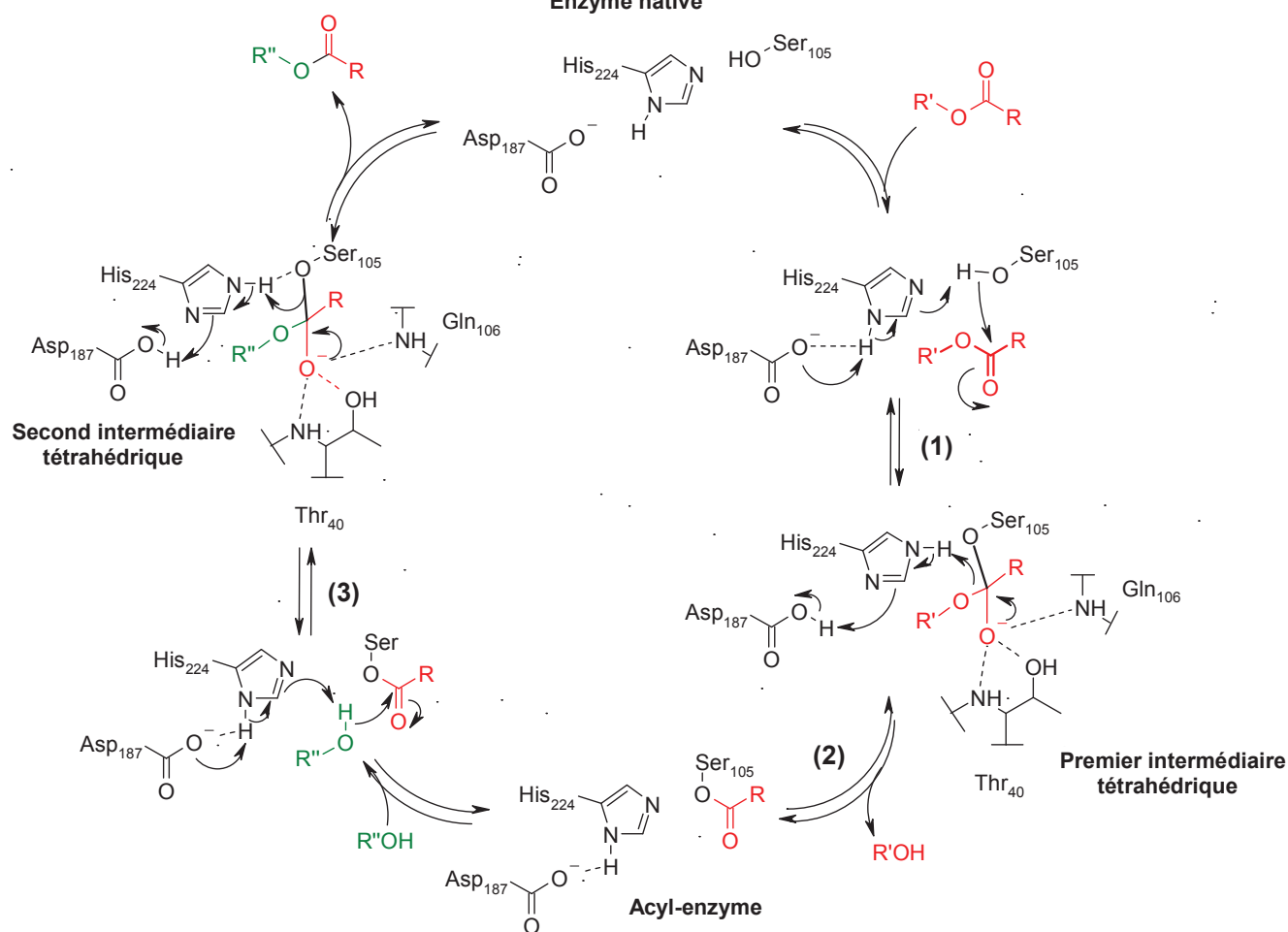


Schéma 4 : Mécanisme réactionnel de l'acylation d'un alcool par la lipase B de *C.antarctica*

³⁴ Cygler M., Grochulski P., Kazlauskas R., Schrag J., Bouthillier F., Rubin B., Serreqi A., Gupta A. A structural basis for the chiral preferences of lipases. *Journal of the American Chemical Society*. 1994, 116, 3180-3186.

La première étape consiste en l'attaque nucléophile de la sérine sur le donneur d'acyle **(1)**, entraînant la formation du premier intermédiaire tétraédrique.

Par départ d'alcool, l'acyl-enzyme se forme **(2)**. L'attaque nucléophile du second substrat sur l'acyl-enzyme provoque la formation du second intermédiaire tétraédrique **(3)** qui est stabilisé par liaisons hydrogènes. Après départ du produit, l'enzyme est retrouvé sous sa forme native.

8. Précisions sur la LBCA : Enzyme thermostable

1. Origines et isolation

La lipase B de *Candida antarctica* fait partie de la classe des hydrolases (E.C. 3.), agissant sur les liaisons ester (E.C. 3.1), côté acide carboxylique (E.C.3.1.1), hydrolysant les triacyl glycérol (E.C.3.1.1.3).

Cet enzyme purifié et caractérisé sous forme de deux isoformes (LACA et LBCA) provient d'un champignon, *Candida antarctica*, présent dans le lac Vanda, en Antarctique.

LBCA est étudiée et utilisée en biotechnologie depuis le début des années 90³⁵. La production de lipase chez *Candida antarctica* étant trop faible pour une exploitation industrielle, le gène de la lipase a été sur-exprimé dans des mycètes comme *Aspergillus oryzae*, afin d'obtenir une quantité suffisante de protéine³⁶. Plus récemment, cette enzyme fut exprimé chez la bactérie *E. coli* avec succès³⁷.

Les lipases A et B de *Candida antarctica* présentent toutes les deux une bonne thermostabilité.

Bien que possédant des applications intéressantes, la lipase A de *Candida antarctica* fut en partie délaissée du fait notamment de la nécessité d'un chargement de l'enzyme très important et de travailler à l'interface^{38,39}.

³⁵ Patkar S.A., Bjorking F., Zundel M., Schulein M., Svendsen A., Heldt-Hansen H.P., Gormsen E. Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors. *Indian Journal of Chemistry*. **1993**, 32, 76-80.

³⁶ Hoegh I., Patkar S., Halkier T., Hansen M.T. Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Canadian Journal of Botanic*. **1995**, 73, 869-875.

³⁷ Blank K., Morfill J., Gump H., Gaub H. Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. **2006**, 125, 474-483.

³⁸ Domínguez de María P., Carboni-Oerlemans C., Tuin B., Bargeman G., van der Meer A., van Gemert R. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2005**, 37, 36-46.

³⁹ Ericsson D., Kasrayan A., Johansson P., Bergfors T., Sandström A., Bäckvall J., Mowbray S. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase a shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *Journal of Molecular Biology*. **2008**, 376, 109-119.

2. Panel de réactions utilisables avec la lipase B de *Candida antarctica*

La lipase B de *Candida antarctica* peut être utilisée dans un grand nombre de réactions et ce, dans une large gamme de température^{40,41}.

La stabilité thermique de cet enzyme est un « plus » pour une utilisation en synthèse organique. Quelques exemples de réaction issus de la littérature sont proposés dans le Tableau 1 :

Réaction	Ref.
Résolution énantiosélective par acylation	42
Hydrolyse énantiosélective	43
Hydrolyse stéréosélective de triglycérides	44

Tableau 1 : Quelques exemples de l'utilisation de la lipase B de *Candida antarctica*

3. Immobilisation de la lipase B de *Candida antarctica*

Depuis l'utilisation avec succès de la lipase B de *Candida antarctica* en synthèse organique, différentes méthodologies ont été mises en œuvre pour augmenter l'activité et la sélectivité de cet enzyme. Des techniques d'immobilisation par inclusion, adsorption ou liaison covalente ont ainsi permis d'augmenter grandement les capacités de la lipase.

Les différents types de supports, associés aux techniques d'immobilisation sont donnés dans le Tableau 2 suivant :

⁴⁰ Majumder A., Ramesh N., Gupta M. A lipase catalyzed condensation reaction with a tricyclic diketone: yet another example of biocatalytic promiscuity. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 5190-5193.

⁴¹ Kobayashi T., Matsuo T., Kimura Y., Adachi S. Thermal Stability of Immobilized Lipase from *Candida antarctica* in Glycerols with Various Water Contents at Elevated Temperatures. *Journal of Oil Chemists' Society*. **2008**, 85, 1081-1084.

⁴² Jürgen Brem J., Liljeblad A., Paizs C., Toşa M., Irimie F., Kanerva L. Lipases A and B from *Candida antarctica* in the enantioselective acylation of ethyl 3-heteroaryl-3-hydroxypropanoates: aspects on the preparation and énantio-préférence. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2011**, 22,-315-322.

⁴³ Dong H.P., Wang Y.J., Zheng Y.G. Enantioselective hydrolysis of diethyl 3-hydroxyglutarate to ethyl (*S*)-3-hydroxyglutarate by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 66, 90-94.

⁴⁴ Rosset I., Tavares M., Assaf E., Porto A. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and 1H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. *Applied Catalysis A: General*. **2011**, 392, 136-142.

Immobilisation	Support
Inclusion	Polysaccharides : chitosan ⁴⁵ , agarose ⁴⁶
Adsorption	Silice mésoporeuse ⁴⁷ , céelite ⁴⁸
Liaison covalente	Dérivés cellulose ⁴⁹ , polymères ^{50,51}

Tableau 2 : Quelques exemples d'immobilisations de lipases

L'immobilisation par inclusion permet de maintenir l'enzyme dans une matrice de polymères ou dans une microcapsule. La matrice peut être retrouvée sous différentes formes comme des polysaccharides ou des polyacrylamides.

L'adsorption est une technique d'immobilisation non covalente de l'enzyme à son support par liaisons de type Van der Waals, hydrogènes ou ioniques. Cette technique simple utilise divers supports comme la céelite, la silice mésoporeuse, l'alumine etc.

L'immobilisation par liaison covalente associe une meilleure stabilité enzymatique sur support. Cette méthode repose sur l'activation préalable du support (au biais d'un carbodiimide, ou par halogénéation etc.) afin de permettre la liaison covalente avec l'enzyme par ses fonction amines, hydroxyles ou acides carboxyliques libres.

Les lipases, comme tous les enzymes sont sensibles au micro-environnement auquel elles sont soumises. Une variation des paramètres réactionnels peut induire un grand changement de l'activité et de la sélectivité enzymatique.

Afin de mieux comprendre les fondamentaux de la biocatalyse enzymatique, certaines équipes tentent d'optimiser des différents paramètres (pH, milieu) en s'affranchissant des effets de solvant, en travaillant dans un réacteur solide/gaz.

⁴⁵ Orrego C.E., Salgado N., Valencia J.S., Giraldo G.I., Giraldo O.H., Cardona C.A. Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects. *Carbohydrate Polymers*. **2010**, 79, 9-16.

⁴⁶ Rodrigues D., Mendes A., Adriano W., Gonçalves L., Giordano R. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2008**, 51, 100-109.

⁴⁷ Kramer M., Cruz J., Pfromm P., Rezac M., Czermak P. Enantioselective transesterification by *Candida antarctica* Lipase B immobilized on fumed silica. *Journal of Biotechnology*. **2010**, 150, 80-86.

⁴⁸ Adamczak M. Synthesis, properties and application of lipase from *Candida antarctica* for high yield monoacylglycerol synthesis. *Polish Journal of Food And Nutrition Sciences*. **2003**, 12, 3-8.

⁴⁹ Karra-Châabouni M., Bouaziz I., Boufi S., Botelho do Rego A.M., Gargouri Y. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2008**, 66, 168-177.

⁵⁰ Li S-F., Chen J-P., Wu W-T. Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2007**, 47, 117-124.

⁵¹ Ye P., Xu Z., Wang Z., Wu J., Deng H., Seta P. Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2005**, 32, 115-121.

III. Optimisation des réactions enzymatiques par utilisation du réacteur solide/gaz

L'équipe AMES (Approches Moléculaires, Environnement-Santé) dispose au laboratoire d'un système expérimental totalement original et très bien adapté aux études fondamentales en enzymologie, à savoir le réacteur continu en milieu solide/gaz. Dans ce réacteur, l'enzyme, utilisée à l'état lyophilisée, est immobilisée sur un support poreux inerte, formant un lit fixe. Celui-ci est percolé par un gaz vecteur qui apporte à l'enzyme les substrats à l'état gazeux et emporte les substrats résiduels et les produits formés après catalyse. Il est possible d'ajouter dans le flux gazeux d'autres composés tels que l'eau ou des composés organiques dont on veut étudier l'effet sur la biocatalyse. L'avantage considérable du système solide/gaz est qu'il permet de faire varier les différents paramètres (quantité de substrat, d'eau, de composés tiers) de façon totalement indépendante les uns des autres, en faisant simplement varier leur pression partielle dans le gaz vecteur. De plus, la quantité de ces différents composés peut être évaluée en utilisant le paramètre « activité thermodynamique » qui est reconnu comme étant le paramètre de choix pour l'enzymologie en milieu non-aqueux.

Grâce à ce système, le laboratoire mène depuis plusieurs années des études d'activité, de stabilité et de spécificité des enzymes. Ces résultats sont confrontés avec la modélisation moléculaire.

L'utilisation de la technologie solide/gaz a pris son essor au début des années 1990, et a été particulièrement développée par les professeurs Legoy, Lamare et Graber.

Par cette technique, des réactions de transestérification ou d'estérification ont été étudiées en présence de la lipase B de *Candida antarctica*, la lipase pancréatique de porc ou la cutinase de *Fusarium Solani*.

1. Utilisation d'un enzyme

Il a été montré que la stabilité était conservée et restait excellente lors de réactions de biocatalyse en réacteur solide/gaz. Par exemple, la transestérification du propionate de méthyle par réaction de transestérification en utilisant la lipase B de *Candida antarctica*

adsorbée sur Chromosorb P conduit à une très faible baisse d'activité de cette dernière avec une diminution de seulement 2,3% en 24 heures de réaction à 70°C (Schéma 5)⁵².

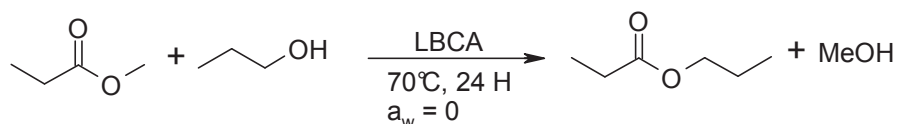


Schéma 5 : Transestérification du propionate de méthyle par le *n*-propanol en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* adsorbée sur Chromosorb P

Plus récemment, Léonard *et al.* ont montré lors de l'étude de la résolution enzymatique du pentan-2-ol en présence de propionate de méthyle (Schéma 6) en réacteur solide/gaz que l'efficacité est fortement dépendante de l'activité en eau⁵³. L'étude a été réalisée à température fixe de 45°C en faisant varier l'activité thermodynamique de l'eau. Ce paramètre est parfaitement contrôlable en réacteur solide/gaz : à une activité thermodynamique a_w en eau de 0,2 un très bon ratio énantiomérique de 194 est obtenu.

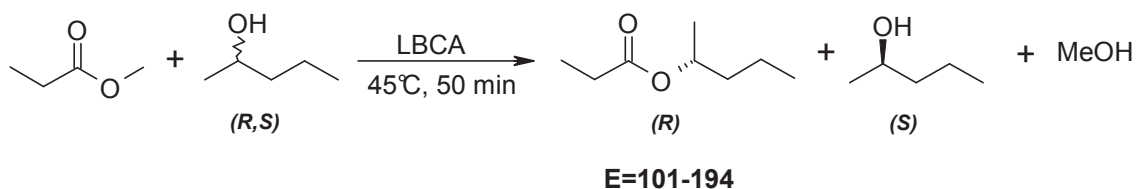


Schéma 6 : Transestérification du propionate de méthyle par le pentan-2-ol racémique en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* adsorbée sur Chromosorb P

2. Utilisation de micro-organismes

Le lit bio-catalytique peut être également composé de micro-organismes.

Dans le cadre de l'élimination propre de composés volatils halogénés, Erable *et al.* ont utilisé des micro-organismes entiers lyophilisés de *Rhodococcus erythropolis*. Lors de

⁵² Bousquet-Dubouch M.P., Graber M., Sousa N., Lamare S., Legoy M.D. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2001**, 1550, 90-99.

⁵³ Léonard-Nevers V., Marton Z., Lamare S., Hult K., Graber M. Understanding water effect on *Candida antarctica* lipase B activity and enantioselectivity towards secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2009**, 59, 90-95.

l'hydrolyse du chlorobutane en butanol en réacteur solide/gaz à 40°C, il a été montré qu'une activité thermodynamique en eau de 0,4 était nécessaire à l'activité de la déhalogénase du micro-organisme. Il est intéressant de noter que l'acide chlorhydrique libéré lors de cette réaction est piégé par la triéthylamine, évitant une inhibition de l'enzyme par les ions chlorures (Schéma 7) ⁵⁴.

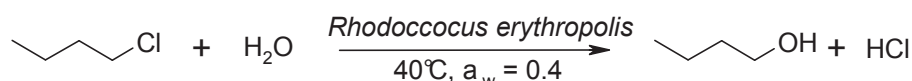


Schéma 7 : Hydrolyse du chlorobutane par le micro-organisme *Rhodococcus erythropolis* en réacteur solide /gaz

Plus récemment, ce micro-organisme ainsi que la bactérie *E. coli* deshydratés ont été utilisés avec succès pour l'hydrolyse de chaînes halogénocarbonées plus longues ⁵⁵ (Schéma 8).

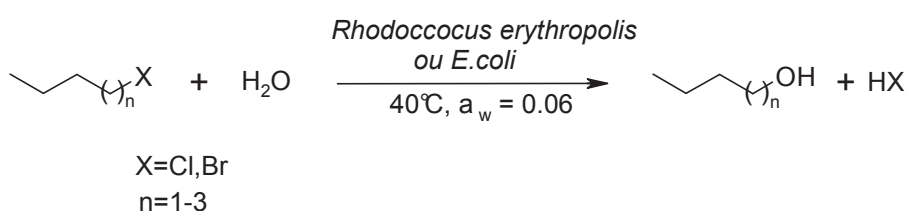


Schéma 8 : Hydrolyse de dérivés halogénés par des micro-organismes en réacteur solide /gaz

Les quantités encourageantes de composés halogénés traités par ces micro-organismes, jusqu'à 836 mg/g de bactérie, pourraient permettre un traitement à grande échelle des composés halogénés volatils toxiques.

L'utilisation du réacteur solide/gaz en synthèse non-conventionnelle permet donc de s'affranchir de la barrière du solvant, notamment par des transferts de masse beaucoup plus efficaces en réacteur solide/gaz que par l'utilisation de solvants organiques.

⁵⁴ Erable B., Maugard T., Goubet I., Lamare S., Legoy M.D. Biotransformation of halogenated compounds by lyophilized cells of *Rhodococcus erythropolis* in a continuous solid-gas biofilter. *Process Biochemistry*. **2005**, 40, 45-51.

⁵⁵ Erable B., Goubet I., Seltana A., Maugard T. Non-conventional gas phase remediation of volatile halogenated compounds by dehydrated bacteria. *Journal of Environmental Management*. **2009**, 90, 2841-2844.

IV. Utilisation de lipases sous irradiation micro-onde

Depuis maintenant une vingtaine d'année, la chimie assistée par micro-onde est en plein essor et ce, quelque soit le domaine de la chimie organique. Bon nombre de laboratoires académiques ou industriels utilisent cette technologie de manière routinière pour mettre en œuvre des protocoles de synthèse^{56,57,58}.

Les rendements obtenus par chauffage micro-onde comparés à ceux obtenus par chauffage traditionnel ou bain d'huile sont généralement bien meilleurs.

Ces effets, non liés à la température sont appelés effets non thermiques ou athermiques.

Néanmoins, parmi la multitude d'articles concernant la chimie sous micro-onde, peu de publications traitent de réactions de biocatalyse sous irradiation micro-onde.

L'étude de l'influence de l'irradiation micro-onde en milieu aqueux a donné lieu à des résultats divergents. Une diminution ou une accélération de l'activité a été démontrée, tandis que d'autres auteurs n'ont révélé aucun effet spécifique des micro-ondes. Le contrôle de la température dans ce type d'expérimentation est obligatoire quand on connaît l'influence de la température sur la stabilité des enzymes. Au laboratoire, Parker *et al.* se sont intéressés à ce type de réaction mais en milieu organique. La transestérification du butanoate d'éthyle par le butanol en présence d'un enzyme, la cutinase a été étudiée en température contrôlée au moyen d'un micro-onde monomode (Schéma 9)⁵⁹.

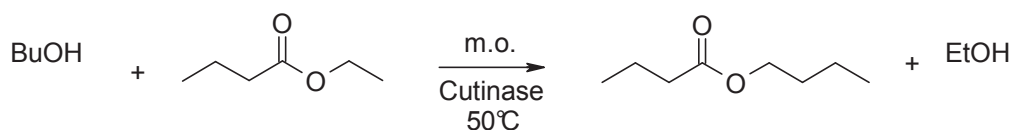


Schéma 9 : Transestérification de l'acétate de butyle par le butanol

⁵⁶ Obermayer D., Glasnov T., Kappe O. Microwave-Assisted and Continuous Flow Multistep Synthesis of 4-(Pyrazol-1-yl)carboxanilides. *Journal of Organic Chemistry*. **2011**, 76, 6657-6659.

⁵⁷ Marquez H., Loupy A., Calderon O., Pérez E. An eco-friendly protocol for synthesis of thiourea derivatives: 1-benzoyl-3-benzylguanidine and 1-benzoyl-3-benzyl-O-ethylisourea. A possible non-purely thermal microwave assisted reaction. *Tetrahedron*. **2006**, 62, 2616-2621.

⁵⁸ Logé C., Testard A., Thiéry V., Lozach O., Blairvacq M., Robert J.M., Meijer L., Besson T. Novel 9-oxo-thiazolo[5,4-f]quinazoline-2-carbonitrile derivatives as dual cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)/glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, 43, 1469-1477.

⁵⁹ Parker M.C., Besson T., Lamare S., Legoy M.D. Microwave radiation can increase the rate of enzyme-catalyzed reactions in organic media. *Tetrahedron Letters*. **1996**, 37, 8383-8386.

Suivant l'hydratation de l'enzyme, un accroissement ou une diminution de la vitesse de réaction d'un facteur 2-3 est observé par rapport au chauffage classique.

Les premières études rapportées dans la littérature portent sur l'impact du chauffage sous irradiation micro-onde sur différents enzymes utilisés en agroalimentaire dont les oxydases, oxygénases ou phénoloxydases. Ces études visaient à montrer une désactivation de ces enzymes par les micro-ondes, ces enzymes étant responsables de l'oxydation, le brunissement ou la dégradation de la saveur des aliments^{60,61,62,63}.

Au cours des années 1990 et 2000, le nombre de réactions enzymatiques catalysées sous irradiation micro-onde n'a cessé d'augmenter. Cependant, elles ne concernent pour la plupart que des substrats de faibles poids moléculaires, monofonctionnels, idéaux pour l'étude de réactions modèles. De plus, l'impact de l'irradiation micro-onde sur le système catalytique est souvent controversé⁸. Ces derniers temps, une large gamme de réactions a été réalisée sous irradiation micro-onde en utilisant différents enzymes, dont les lipases comme biocatalyseur pour prouver ou réfuter l'impact de l'irradiation micro-onde sur le système enzymatique.

Spécificité de l'activation micro-onde

L'activation micro-onde résulte de deux contributions :

- une origine purement thermique résultant de l'agitation moléculaire causée par l'inversion des dipôles avec les alternances du champ électrique. Les outils pour mesurer les températures au niveau microscopique doivent être cependant développés pour mesurer précisément ce phénomène.

⁶⁰ Ramezanzadeh F., Rao R., Prinyawiwatkul W., Marshall W., Windhauser M.. Effects of microwave heat, packaging, and storage temperature on fatty acid and proximate compositions in rice bran. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **2000**, 48, 464-467.

⁶¹ Matsui K.N., Granado L.M., Oliveira P.V., Tadini C.C. Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions. *LWT*. **2007**, 40, 852-859.

⁶² Ponne C.T., Moller A., Tijssens L.M.M., Bartels P.V., Meijer M.M.T. Influence of microwave and steam heating on lipase activity and microstructure of rapeseed (*Brassica napus*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **1996**, 44, 2818-2824.

⁶³ Keying Q., Changzhong R., Zaigui L. An investigation on pretreatments for inactivation of lipase in naked oat kernels using microwave heating. *Journal of Food Engineering*. **2009**, 95, 280-284.

- une contribution spécifique, d'origine électrostatique, résultant d'interactions de type dipôle-dipôle entre les molécules polaires et le champ électrique : l'apparition de charges dans l'état de transition, comme par exemple la formation d'un intermédiaire tétraédrique, stabilisé sous irradiation micro-onde.

L'importance relative de ces deux types d'effet peut être appréciée en comparant les résultats obtenus en chauffage classique et sous irradiation micro-onde.

1. Synthèse et dégradation d'acides/esters gras

1. Synthèse de biodiesel

Les lipases sont des enzymes qui nativement sont utilisées pour la synthèse ou la dégradation de corps gras. Cette capacité leurs confère de nombreuses applications dans le domaine industriel, et notamment dans la synthèse de nouveaux carburants comme le biodiesel, au départ de triglycérides ⁶⁴.

La synthèse de biodiesel par transformation efficace de la biomasse disponible présente de nombreux avantages et intérêts ⁶⁵ :

- Compatibilité totale avec les moteurs diesels actuels
- Aucune toxicité des biodiesels
- Complète biodégradabilité
- Aucune évaporation de produits dangereux
- Procédé vert

Le biodiesel peut être synthétisé par transestérification des triglycérides par le méthanol en présence de lipases. La molécule résultante, l'ester méthylique d'acide gras sera le fuel recherché (Schéma 10) ⁶⁶.

⁶⁴ Hasan F., Shah A.A., Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, 39, 235-251.

⁶⁵ Hernández-Martín E., Otero C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 277-286.

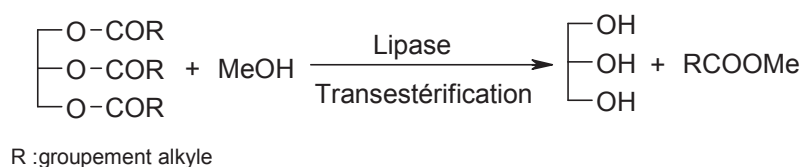


Schéma 10 : Transestérification de triglycérides pour former le biodiesel

Afin d'obtenir les esters méthyliques d'intérêt, une hydrolyse préalable ou une transestérification d'un triglycéride doit être réalisées. En conditions classiques, ou sous irradiation micro-onde, les acides et bases fortes utilisés pour la saponification des triglycérides issus des huiles peuvent endommager les équipements ⁶⁷.

L'utilisation de lipases permet de réaliser ces hydrolyses spécifiques de façon douce. Réutiliser la capacité native des lipases dans la dégradation des graisses présente un réel intérêt. Cependant, les procédés d'hydrolyse régiospécifique sous irradiation micro-onde restent à optimiser. Ils sont moins efficaces que les méthodes chimiques traditionnelles ⁶⁸.

Pour augmenter l'activité catalytique des lipases, l'équipe de Yu a étudié la transestérification de l'huile de soja avec le méthanol en utilisant le Novozyme 435 sous irradiation micro-onde. Dans ce mode de chauffage, les taux enzymatiques sont augmentés d'un facteur 1.5 par rapport au chauffage traditionnel. Après 12 heures sous irradiation micro-onde, un rendement 94% est obtenu alors que, dans les mêmes conditions, l'équilibre réactionnel n'est pas encore atteint sous chauffage conventionnel ⁶⁹.

2. Valorisation du glycérol et de triglycérides

1. Estérification du glycérol

Des mono, di ou triglycérides d'intérêt pour l'industrie agrochimique ⁷⁰ peuvent être préparés par estérification du glycérol et de l'acide octanoïque (Schéma 11).

⁶⁶ Akoh C., Chang S., Lee G., Shaw J. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **2007**, 55, 8995–9005.

⁶⁷ Kamath H.V., Regupathi I., Saidutta M.B. Optimization of two step karanja biodiesel synthesis under microwave irradiation. *Fuel Processing Technology*. **2011**, 92, 100-105.

⁶⁸ Talukder M., Wu J., Fen N., Li Y. Melissa S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*. **2010**, 49, 207–212.

⁶⁹ Yu D., Tian L., Ma D., Wu H., Wang Z., Wang L. Fang X. Microwave-assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435. *Green Chemistry*. **2010**, 12, 844-850.

⁷⁰ Trivedi R., Singh R.P. Modification of oils and fats to produce structure lipids. *Journal of Oleo Science*. **2005**, 54, 423-430.

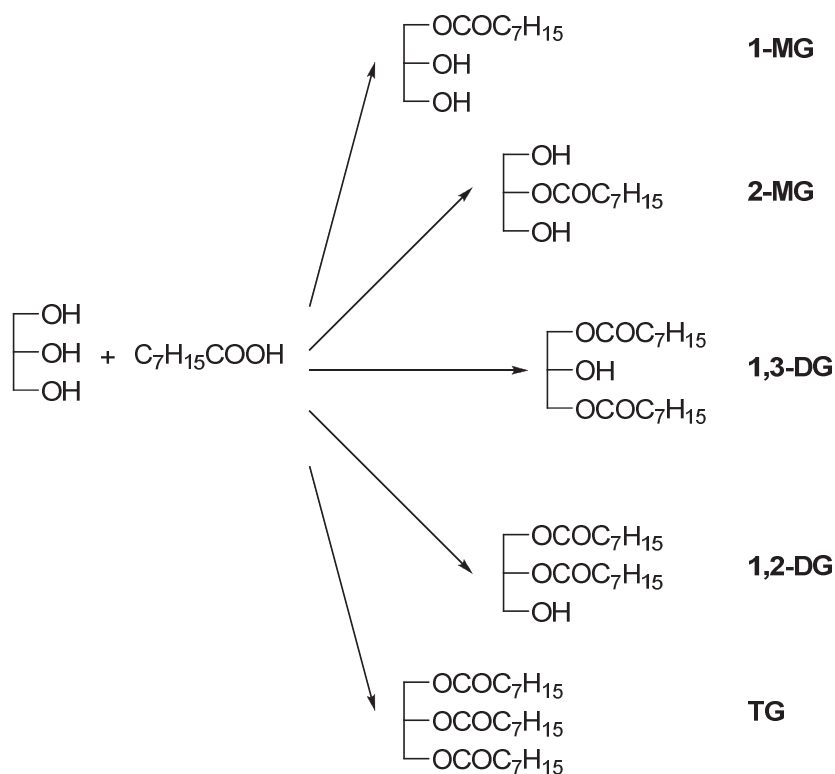


Schéma 11 : Estérification du glycérol biocatalysée par des lipases, en mono-glycérides (MG), di-glycérides (DG) et triglycérides (TG)

Les mono- et diglycérides sont par exemple des émulsifiants très employés dans l'industrie ⁷¹. Les lipases, du fait de leur stéréosélectivité, peuvent donc être utilisées pour la digestion de triglycérides, mais elles ne possèdent cependant pas toutes la même sélectivité vis-à-vis de la dégradation des triglycérides. Un screening de différentes lipases a été réalisé par Xia lors de l'hydrolyse d'un triester caprylique de glycérol, sous champ micro-onde, et ce, afin de déterminer la spécificité des lipases entre 40 et 60°C ⁷² (Tableau 3).

⁷¹ Ferreira-Dias S., Correia A.C., Fonseca M.M. Response surface modeling of glycerolysis catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2003**, 21, 71-80.

⁷² Xia Y.M., Fang Y., Zhang K.C., Shi G.Y., Brown J.J. Enzymatic Synthesis of partial glycerol caprate in solvent-free media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2003**, 23, 3-8.

Lipase	1-MG/2-MG		1,3-DG/1.2-DG	
	CC	m.o.	CC	m.o.
Lipozyme RM	55.6	28.4	34.3	11.8
Novozyme 435	56.4	35	25.6	13.5
Lipolase 100	68.3	45.4	30.3	17
Lipase	6.6	4.4	3.2	1.7

Tableau 3 : Spécificité de l'hydrolyse des triglycérides en mono (MG) et diglycérides (DG) en comparant chauffage classique (CC) et sous irradiation micro-onde (m.o.) à 40°C.

La LBCA (Novozyme 435) ou celle de *Rhizomucor meihei* (RM) restent les plus intéressantes dans l'hydrolyse de l'ester caprylique. L'irradiation micro-onde semble avoir un grand impact sur l'activité et la stéréosélectivité des enzymes. Cependant, dans tous les cas, lors de l'utilisation de la technologie micro-onde, une baisse de spécificité est remarquée dans l'hydrolyse en mono et diglycérides.

2. Hydrolyse de triglycérides

L'hydrolyse de la trioléine réalisée sous irradiation micro-onde en système ouvert permet une hydrolyse complète en glycérol et acides oléiques en 75 secondes à 800W en utilisant la lipase d'*Aspergillus carneus*. A 175W, la conversion est complète en 180 secondes (Schéma 12).

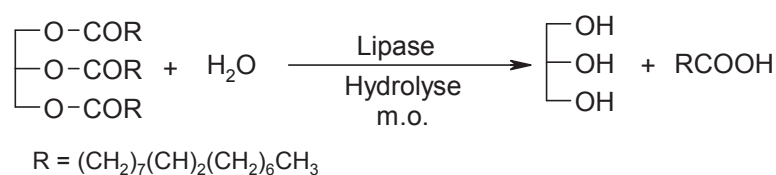


Schéma 12 : Hydrolyse de la trioléine par la lipase d'*Aspergillus carneus*

Cependant, l'effet de l'irradiation sur le système reste ambigu. En effet, une température de 40°C est atteinte dans le système à 175W, alors que 90°C sont mesurés à pleine puissance. Un effet purement thermique n'est pas à exclure ⁷³.

⁷³ Saxena R.K., Isar J., Saran S., Kaushik R., Davidson W.S. Efficient microwave-assisted hydrolysis of triolein and synthesis of bioester, bio-surfactant and glycerides using *Aspergillus carneus* lipase. *Current Science*. **2005**, 89, 1000-1003.

Suivant la nature de la lipase, l'hydrolyse peut être encore plus rapide, en moins de 30 secondes. Les activités enzymatiques sont 7 à 12 fois supérieurs à ceux obtenus en chauffage classique.

L'hydrolyse partielle de l'huile de palme en diglycérides a été réalisée sous irradiation micro-onde, en flux continu à 80°C en utilisant la lipase de *Pseudomonas cepacia* (Schéma 13)⁷⁴.

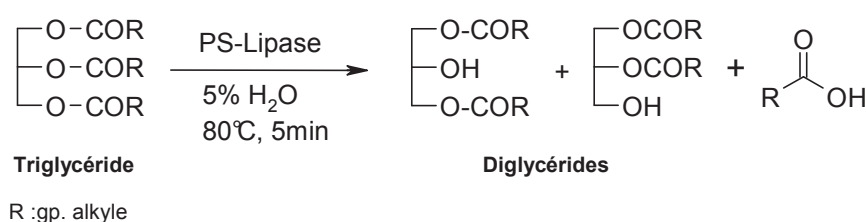


Schéma 13 : Hydrolyse de l'huile de palme par utilisation de la lipase de *Pseudomonas cepacia* sous irradiation micro-onde

A 80 °C, la lipase de *Pseudomonas cepacia* sous sa forme libre est capable d'hydrolyser 30 % de ce mélange d'huile en seulement 5 minutes d'irradiation, permettant d'obtenir jusqu'à 128 grammes de produit monohydrolysé en 24 heures.

2. Valorisation de l'amidon

L'amidon est l'une des principales matières premières renouvelables d'origine végétale. Ce polysaccharide disponible en abondance est biodégradable et peu onéreux. Sa transformation chimique par estérification permet l'obtention de nouveaux matériaux ayant des propriétés physico-chimiques intéressantes, comme une meilleure résistance thermique, de nouvelles propriétés rhéologiques ou une meilleure solubilité⁷⁵.

L'une des modifications structurelles de l'amidon concerne l'estérification de ces fonctions hydroxyles. Elle peut être réalisée en conditions douces, en présence d'acide oléique avec un biocatalyseur comme la lipase de *Streptococcus aureus*. L'équipe de de Sayari à

⁷⁴ Matos L., Leal I., Souza R. Diacylglycerol synthesis by lipase-catalyzed partial hydrolysis microwave irradiation and continuous flow conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2011**, 72, 36-39.

⁷⁵ Singh J., Kaur L., McCarthy O.J. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocolloids*. **2007**, 21, 1-22.

conduit cette réaction sous irradiation micro-onde à 44°C, conduisant au produit estérifié avec un rendement de 76% après seulement 4 heures.

L'estérification de corps gras comme l'huile de noix de coco ou de palme, à 40°C en présence de *Candida rugosa* sous irradiation micro-onde conduit à des degrés de substitution bien meilleurs qu'à ceux obtenus par milieu classique (2,86 sous m.o. contre 1,88 par chauffage classique). Ce nouvel amidon possède des propriétés thermoplastiques le rendant plus hydrophobe et plus stable. Cependant, sous irradiation micro-onde, la durée de demi-vie de l'enzyme est diminuée (1min15) comparé au chauffage traditionnel (30min)⁷⁶.

3. Résolution d'alcools secondaires

1. Généralités

Les lipases, du fait de leur grande sélectivité peuvent séparer efficacement un mélange racémique. L'énantiomère pur ainsi formé pourra être utilisé en synthèse organique classique comme précurseur de molécules chirales.

D'une manière générale, l'acylation d'une fonction alcool secondaire est un moyen simple de séparer deux énantiomères par réaction de transestérification. L'ester nouvellement formé de façon sélective pourra être aisément séparé par chromatographie (Schéma 14).

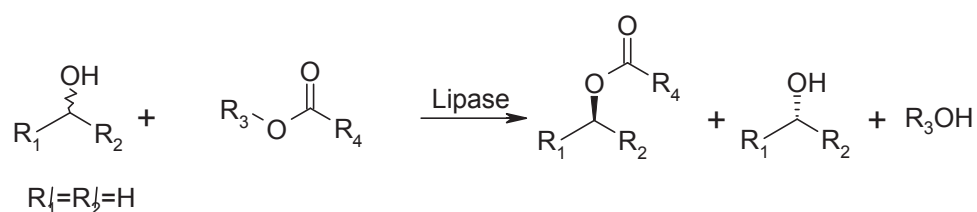


Schéma 14 : Déracémisation d'un mélange inséparable d'énantiomères par résolution enzymatique

Un donneur d'acyle est nécessairement utilisé par l'enzyme pour transformer sélectivement l'un des deux énantiomères du mélange racémique. Selon la nature du donneur d'acyle et de son encombrement, l'efficacité de la catalyse enzymatique est susceptible de varier⁷⁷.

⁷⁶ Horchani H., Chaâbouni M., Gargouri Y., Sayari A. Solvent-free lipase catalyzed synthesis of long-chain starch esters using microwave heating : Optimization by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*. **2010**, 79, 466-474.

⁷⁷ Chênevert R., Pelchat N., Morin P. Lipase-mediated enantioselective acylation of alcohols with functionalized vinyl esters: acyl donor tolerance and applications. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2009**, 20, 1191-1196.

Les donneurs de type ester de vinyle sont les plus utilisés. L'acétaldéhyde formé lors de la résolution possède une faible pression de vapeur (88mmHg à 20°C), et quitte aisément le site actif de l'enzyme (Schéma 15). Les réactions de transestérification au départ d'un tel ester sont irréversibles.

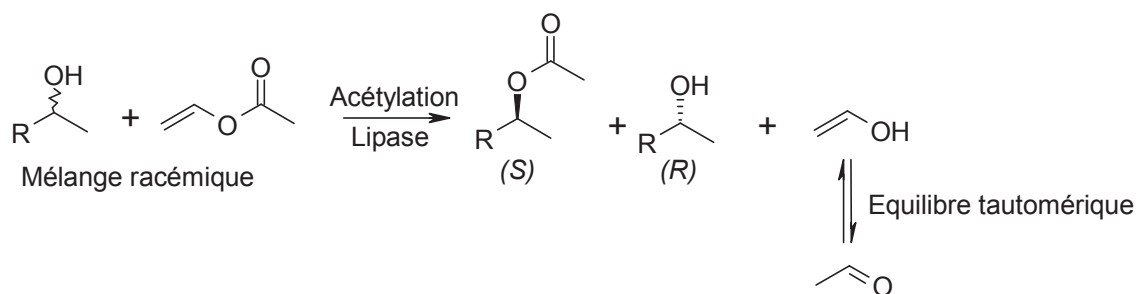


Schéma 15 : Exemple d'acétylation d'un alcool secondaire conduisant à la formation de l'acétaldéhyde

Néanmoins, Pleiss a montré que dans certains cas, l'acétaldéhyde peut réagir comme une base de Schiff et dénaturer l'enzyme⁷⁸. Cette réaction chimique survient en présence d'un résidu amine libre d'une chaîne latérale d'un acide aminé, comme la lysine ou l'asparagine (Schéma 16).

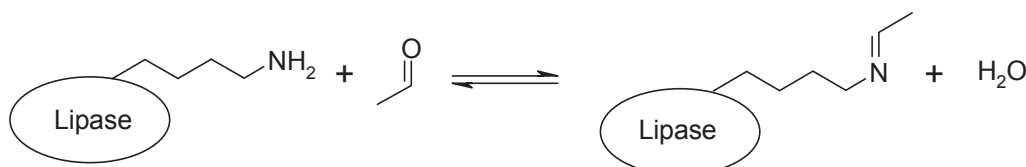


Schéma 16 : Réaction entre l'acétaldéhyde et le résidu amine de la lysine de l'enzyme

2. Résolution de divers alcools secondaires sous irradiation micro-onde

La résolution cinétique d'alcools secondaires demeure essentielle pour le chimiste organicien. L'équipe de Brimble a dernièrement réalisé la résolution efficace de différents alcools secondaires, dérivés d'alcools aryliques ou benzyliques diversement substitués en présence de la lipase B de *Candida antarctica*, en utilisant un donneur d'acyle de type acétate d'acyle : l'acétate de chlorobenzyle (Schéma 17)⁷⁹.

⁷⁸ Weber H., Zuegg J., Faber K., Pleiss J. Molecular reasons for lipase-sensitivity against acetaldehyde. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **1997**, 3, 131-138.

⁷⁹ Bachu P., Gibson J.S., Sperry J., Brimble M.A. The influence of microwave irradiation on lipase-catalysed kinetic resolution of racemic secondary alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2007**, 18, 1618-1624.

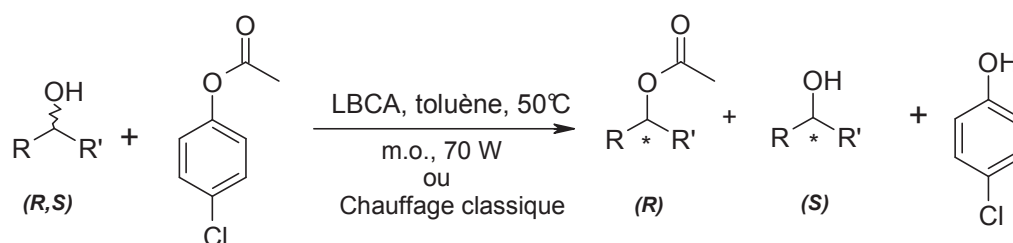


Schéma 17 : Résolution d'alcools secondaires par la lipase B de *Candida antarctica*

Après 4 heures de chauffage dans le toluène à 50°C en utilisant la lipase B de *Candida antarctica*, d'excellents taux de conversions et excès énantiomériques sont observés. La comparaison chauffage traditionnel/irradiation micro-onde montre une bien meilleure sélectivité et conversion par chauffage micro-onde (Tableau 4).

Dans tous les cas, l'alcool résiduel est obtenu avec une configuration (S) et l'ester de configuration (R).

L'énantiopréférence de la lipase B de *Candida antarctica* vise la formation de l'énantiomère (R).

Substrat	Temps (h)	Irradiation micro-onde			Chauffage conventionnel		
		Ester ee (%)	Alcool ee (%)	c (%)	Ester ee (%)	Alcool ee (%)	c (%)
	4	>99	99	50	>99	55	36
	5	>99	92	48	>99	53	35
	6	>99	58	37	>99	6	6
	6	>99	93	48	99	26	21
	12	-	-	-	-	-	-

Tableau 4 : Comparaison de la résolution d'alcools secondaires biocatalysée par des lipases par chauffage conventionnel et sous irradiation micro-onde

Ces résultats indiquent que l'utilisation de l'irradiation micro-onde donne de bien meilleures taux de conversion sur tous les alcools secondaires testés comparé au chauffage classique, avec par exemple une conversion complète du (*R*)-phénylpropanol sous irradiation micro-onde, comparé aux 36% obtenus en chauffage classique.

Cependant, bien que l'irradiation micro-onde semble avoir provoqué une augmentation de l'activité et de la sélectivité enzymatique (par exemple des conversions totalement sélectives par irradiation micro-onde et non par chauffage traditionnel pour une même durée réactionnelle), les alcools secondaires les plus encombrés ne sont pas utilisés par la lipase, quel que soit le mode de chauffage.

3. Etude de la résolution du phényléthanol

L'utilisation d'enzyme en synthèse organique favorise la réalisation de synthèses énantiosélectives. La technique d'immobilisation d'enzymes sur supports solides (minéraux ou résine organiques) en milieu sec permet de mener des réactions à des températures plus élevées que classiquement (90-100°C au lieu de 40-60°C)

Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à la résolution modèles de type phényléthanol et ont étudié la sélectivité sous chauffage traditionnel comparé à celle sous irradiation micro-onde (Schéma 18)^{80,81,82,83}.

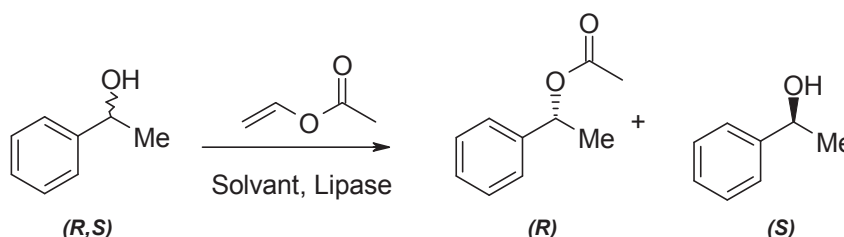


Schéma 18 : Résolution du phényléthanol par utilisation de lipases en chauffage classique

⁸⁰ Shah S., Gupta M. Kinetic resolution of (\pm)-1-phenylethanol in [Bmim][PF₆] using high activity preparations of lipases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2007**, 17, 921–924.

⁸¹ Xue P., Yan X., Wang Z. Lipase immobilized on HOOC-MCF: A highly enantioselective catalyst for transesterification resolution of (*R,S*)-1-phenylethanol. *Chinese Chemical Letters*. **2007**, 18, 929–932.

⁸² Habulin M., Knez Z. Optimization of (*R,S*)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2009**, 58, 24–28.

⁸³ Chua L., Sarmidi M. Effect of solvent and initial water content on (*R,S*)-1-phenylethanol resolution. *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, 38, 551–556.

Récemment, la même résolution a été ré-étudiée par l'équipe de Kappe ⁸⁶ qui a comparé la résolution en conditions classiques et par chauffage sous irradiation micro-onde en utilisant une verrerie en quartz et en associant un contrôle de la température par fibre optique (Schéma 20 et Figure 3).

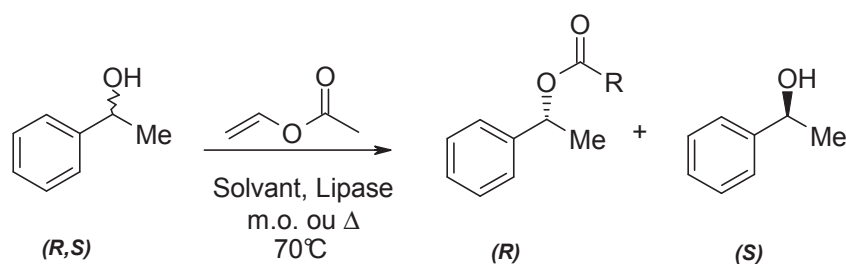


Schéma 20 : Résolution du phényléthanol biocatalysée par des lipases

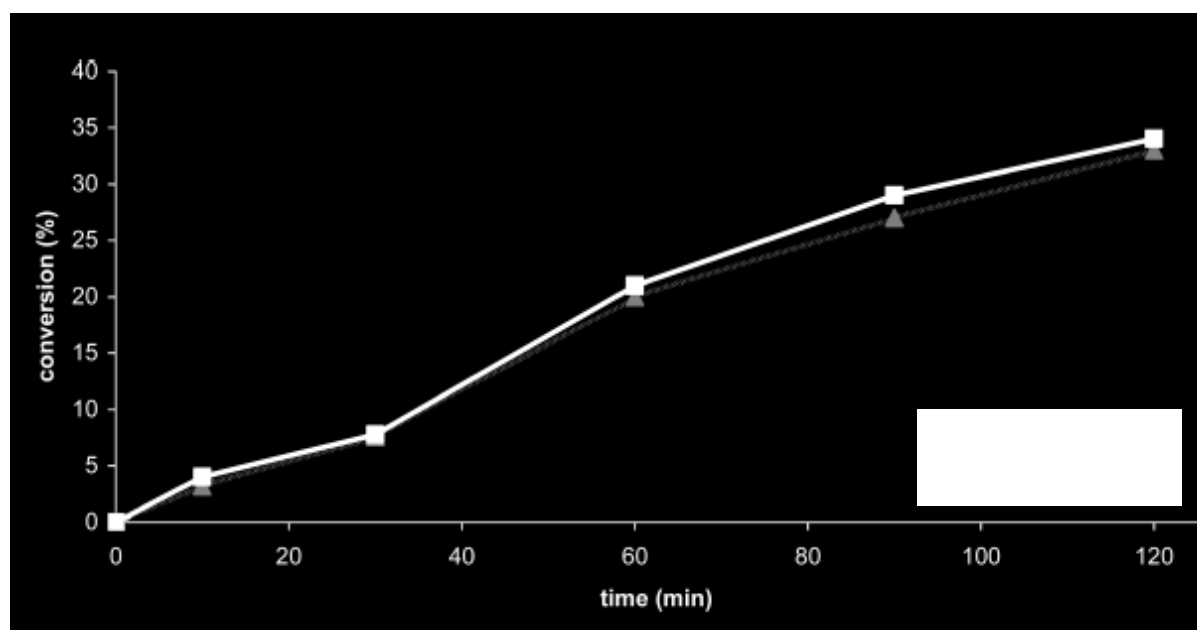


Figure 3 : Comparaison entre chauffage classique (▲) et irradiation micro-onde (■) lors de la résolution du phényléthanol à 40°C dans le cyclohexane

Après 2 heures de réaction, Kappe n'a observé aucune différence entre chauffage classique et chauffage sous irradiation micro-onde, et ce, pour toutes les lipases testées (Lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur céramique, ou libre, lipase de *Candida antarctica* immobilisée sur Accurel, lipase de *Mucor miehei* ou de *Thermomyces lanuginosus*).

⁸⁶ Octavio R., Souza M.A., Antunes O.A.C., Kroutil W., Kappe O. Kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol with immobilized lipases: a critical comparison of microwave and conventional heating protocols. *Journal of Organic Chemistry*. 2009, 74, 6157-6162.

Cependant, bien que la réaction enzymatique soit identique avec celle réalisée par l'équipe de Carrillo-Munoz, les paramètres réactionnels sont très différents, d'où la forte modification des activités et sélectivités enzymatiques (Schéma 21 et Tableau 5).

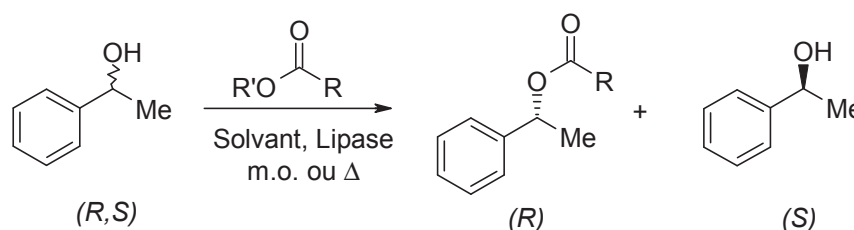


Schéma 21 : Résolution du phényléthanol par des lipases sous irradiation micro-onde ou en chauffage classique

Paramètres	Travaux de Loupy	Travaux de Kape
R	CH ₂ CH ₃	CH ₃
R'	C ₇ H ₁₅	CHCH ₂
Equivalent de donneur d'acyle	3	2
Pourcentage massique de lipase	400%	2%
T°C	90°C	70°C
c (%)	40	52
Alcool ee _s (%)	62	97
E	50	>200

Tableau 5 : Comparaison des paramètres réactionnels étudiés par Loupy et Kape lors de la résolution du phényléthanol

En comparant ces résultats, on remarque une forte disparité des conditions expérimentales, avec notamment, un choix de donneur d'acyle différent, et surtout un chargement enzymatique non-comparable. Tous ces changements mènent à une grande différence d'activité et de sélectivité enzymatique.

4. Résolution du 1,2,3,4-tétrahydronaphtol

Lin a reporté la résolution du 1,2,3,4-tétrahydronaphtol en utilisant la lipase pancréatique de porc (PPL), divers donneurs d'acyle, à 25°C, en chauffage classique ou à 35°C sous irradiation micro-onde⁸⁷ (Schéma 22 et Tableau 6).

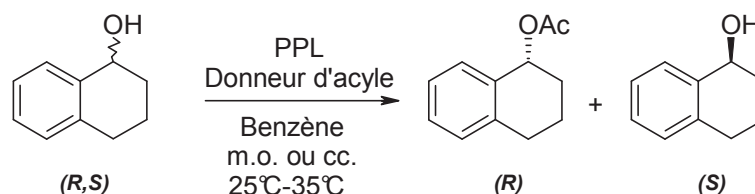


Schéma 22 Résolution du 1,2,3,4-tétrahydronaphtol par utilisation de la PPL en chauffage classique et sous irradiation micro-onde

Entrée	Mode de chauffage	Donneur d'acyle	Conversion (%)	Alcool ee (%)	Ester ee (%)	E
1	Classique, 25°C	Acétate de vinyle	33	43	33	19
2	m.o., 35°C	Acétate de vinyle	22	28	22	142
3	Classique, 25°C	Butyrate de vinyle	51	94	51	64
4	m.o., 35°C	Butyrate de vinyle	31	44	31	196
5	Classique, Reflux	Acide palmitique	45	65	45	16
6	m.o., Reflux	Acide palmitique	36	54	36	117

Tableau 6 : Résolution du 1,2,3,4-tétrahydronaphtol par utilisation de la PPL en chauffage classique et sous irradiation micro-onde

Bien qu'une meilleure sélectivité enzymatique soit obtenue sous irradiation micro-onde comparée au chauffage classique en ce qui concerne l'acétate de vinyle et le butyrate de vinyle (entrée 1-4), les températures imposées ne sont pas identiques. Il est donc difficile de conclure sur un effet athermique de la réaction. En outre, par utilisation de l'acide palmitique en tant que donneur d'acyle, les deux modes de chauffage sont utilisés à des températures au reflux (entrées 5 et 6). Dans tous les cas, la réaction de biocatalyse sous micro-onde avec la

⁸⁷ Lin G., Lin W. Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions. *Tetrahedron Letters*. **1998**, 39, 4333-4336.

lipase pancréatique de porc conduit à un ratio énantiomérique largement supérieur comparé au chauffage classique (E = 117 sous chauffage micro-onde et E = 16 en chauffage classique).

En plus du 1,2,3,4-tétrahydronaphtol, la résolution de l'indan-2-ol a été réalisée par la même équipe en utilisant les mêmes donneurs d'acyle que précédemment (Schéma 23).

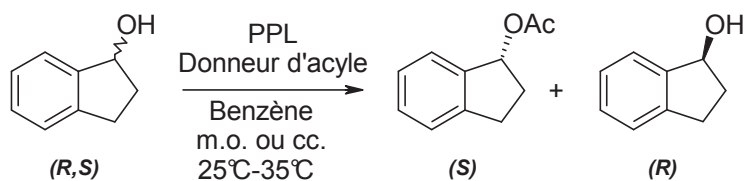


Schéma 23 : Résolution de l'indanol en présence de la PPL

Par utilisation de fours micro-onde en système ouvert ou en chauffage conventionnel, de très bons taux de conversion (allant jusqu'à 51%) et excès énantiomériques (jusqu'à 99% pour le produit et 94% pour le substrat) sont retrouvés. Les ratios énantiomériques observés sont aussi supérieurs sous irradiation micro-onde (E = 265) que par chauffage classique (E = 54). Les auteurs expliquent cette augmentation d'activité par des élévations locales de pression autour de l'enzyme.

Cependant, l'utilisation des mêmes conditions lors de la résolution du menthol ne permet qu'une faible conversion du substrat, on observe essentiellement la dimérisation de l'acide palmitique en anhydride palmitique (Schéma 24).

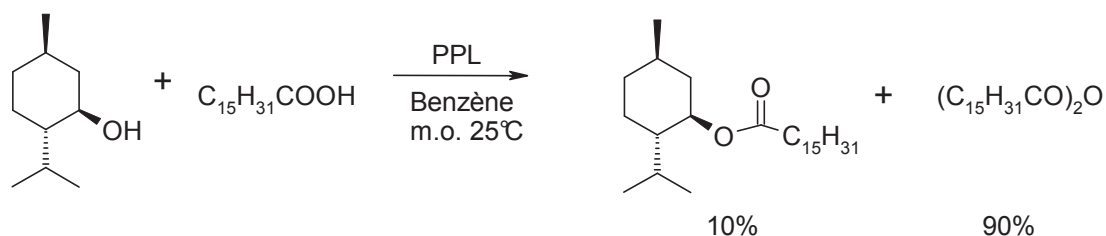


Schéma 24: Tentative de résolution du menthol sous irradiation micro-onde

5. Résolution d'alcools secondaire linéaires

Pour tenter de lever les doutes en ce qui concerne les encombrements stériques ou les répartitions de charges électroniques, certaines équipes se sont focalisées sur l'étude de la résolution d'alcools secondaires linéaires non ramifiés. Cette réaction modèle aide à mieux comprendre les paramètres enzymatiques^{88,89}.

Des effets non thermiques de l'irradiation micro-onde sur l'enzyme sont ainsi remarqués lors de la résolution de l'octan-2-ol racémique en présence de la lipase B de *Candida antarctica* et de l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle (Schéma 25).

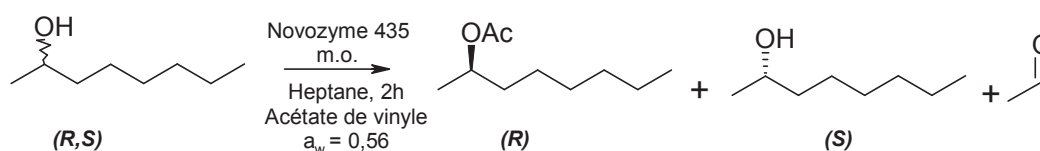


Schéma 25 : Résolution de l'octan-2-ol en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme 435)

Parmi tous les solvants utilisés, l'heptane s'avère un solvant de choix pour cette résolution. Après deux heures de réaction à 60°C en présence de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (Novozyme 435), un rendement de 51% est obtenu. L'ester affiche un excès énantiomérique de 99% par utilisation du micro-onde, avec une activité 4 fois supérieure que dans les mêmes conditions, en chauffage classique.

La réaction a été effectuée dans un réacteur en quartz au sein d'un milieu très apolaire. la montée en température sous irradiation micro-onde peut s'expliquer par le fait de l'activité en eau ici de 0,56 qui permet d'augmenter suffisamment la polarité du milieu.

6. Optimisation des résolutions par la résolution cinétique séquentielle (SKR)

Bien que la résolution de molécules racémiques soit efficace en utilisant des enzymes, la limitation majeure est la quantité de produit énantiopur pouvant être obtenue lors d'une réaction totalement énantiosélective (50%), correspondant à la consommation totale de l'un des deux énantiomères. Afin d'augmenter les rendements, il est possible de suivre une

⁸⁸ Straathof A., Panke S., Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology*. **2002**, 13, 548-556.

⁸⁹ Yu D., Wang Z., Chen P., Jin L., Cheng Y., Zhou J., Cao S. Microwave-assisted resolution of (R,S)-2-octanol by enzymatic transesterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2007**, 48, 51-57.

résolution cinétique séquentielle ou SKR ^{90,91}. Cette méthode repose sur la racémisation du substrat qui n'a pas été utilisé par l'enzyme et permet ainsi sa réutilisation par le catalyseur ^{92,93}.

Cette méthode peut être couplée au champ micro-onde afin d'augmenter l'activité enzymatique.

La résolution de l'octan-2-ol a ainsi été réalisée en utilisant la technologie SKR par l'équipe de Cao ⁹⁴. Un flux continu de substrat passe au travers de l'enzyme de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur une résine mésoporeuse (SBA-15). Le substrat qui n'a pas réagi est oxydé par le trioxyde de chrome (1), puis est réduit par le tétraborohydrure de sodium (2) pour reformer l'octan-2-ol racémique (Schéma 26).

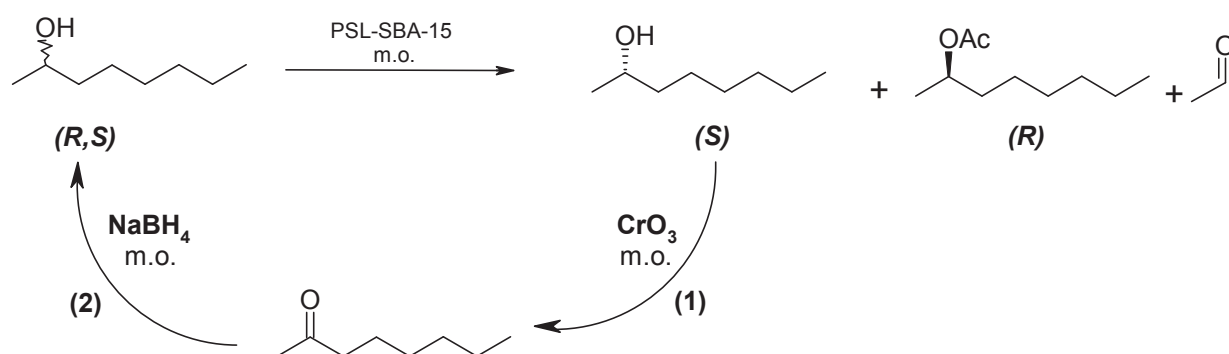


Schéma 26 : Résolution cinétique séquentielle de l'octan-2-ol assistée sous irradiation micro-onde

Par utilisation de cette méthode SKR, couplée à l'irradiation micro-onde, de meilleurs rendements sont observés (84% en 2 heures, comparé aux 51% par résolution cinétique classique), tout en maintenant le même excès énantiomérique. Le ratio énantiomérique est supérieur sous irradiation micro-onde ($E = 328$), par rapport au chauffage classique ($E = 104$). Un gain d'un facteur 3 est observé.

⁹⁰ Pellissier. Recent developments in dynamic kinetic resolution. *Tetrahedron*. **2011**, 67, 3769-3802.

⁹¹ Turner N.J. Deracemisation methods. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, 14, 115-121.

⁹² Cheng Y., Xu G., Wu J., Zhang C., Yang L. Highly efficient dynamic kinetic resolution of secondary aromatic alcohols with low-cost and easily available acid resins as racemization catalysts. *Tetrahedron Letters*. **2010**, 51, 2366-2369.

⁹³ Parvulescu A., Jacobs P., De Vos D. Support influences in the Pd-catalyzed racemization and dynamic kinetic resolution of chiral benzylic amines. *Applied Catalysis A: General*. **2009**, 368, 9-16.

⁹⁴ Yu D., Chen P., Wang L., Gu Q., Li Y., Wang Z., Cao S. A chemo-enzymatic process for sequential kinetic resolution of (R,S)-2-octanol under microwave irradiation. *Process Biochemistry*. **2007**, 42, 1312-1318.

4. Biocatalyse en solvant ionique

Le solvant joue un rôle fondamental dans l'efficacité de la biocatalyse. En effet, l'enzyme a besoin d'une couche superficielle d'eau afin de maintenir son intégrité. Placées dans un solvant trop polaire, les molécules d'eau vont être solubilisées par le solvant et provoquer une dégradation de l'enzyme (Schéma 27).

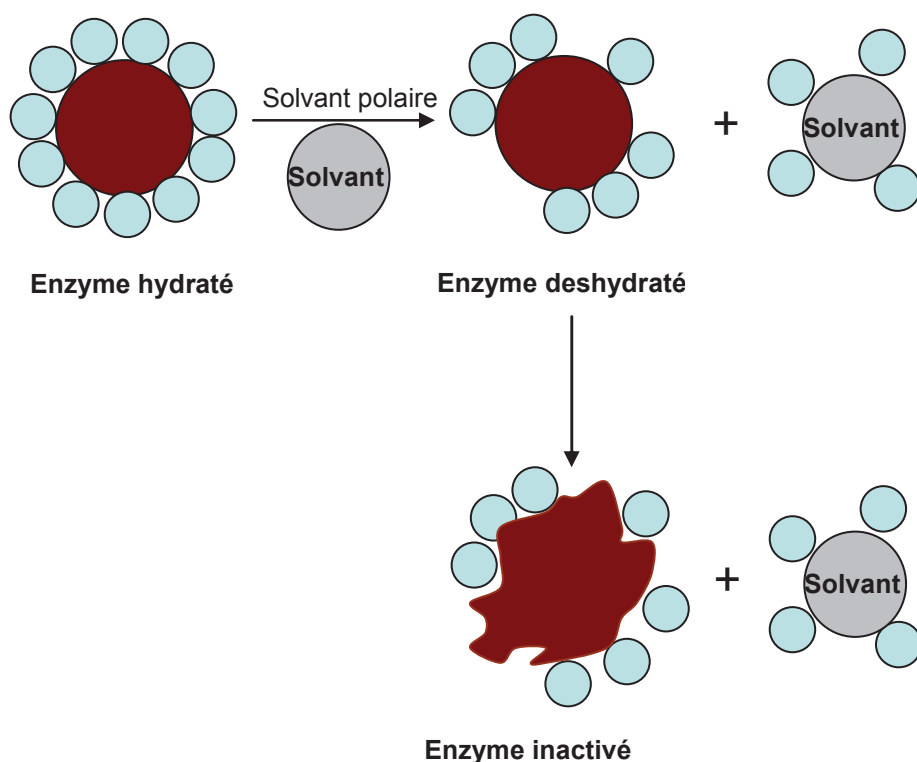


Schéma 27 : Dégradation de l'enzyme par les solvants organiques polaires

Il est donc fondamental pour l'enzyme de choisir un solvant adéquat, qui permette une bonne solubilité des composés tout en maintenant l'intégrité de l'enzyme.

Les liquides ioniques sont des solvants non-volatiles, possédant une faible pression de vapeur, non-inflammables, ce qui les rendent attractifs pour la synthèse organique⁹⁵.

Ils sont aussi utilisés avec succès pour des réactions de biocatalyse⁹⁶. Par exemple, en chauffage classique, des réactions de résolution d'alcools secondaires ont été réalisées avec

⁹⁵ Durand J., Teuma E., Gómez M. Ionic liquids as a medium for enantioselective catalysis. *Comptes Rendus Chimie*. **2007**, 10, 152-177.

⁹⁶ Welton T. Room temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chemical Reviews*. **1999**, 99, 2071-2084.

succès en présence de liquides ioniques en tant que solvant ou co-lyophilisés avec la lipase (Schéma 28) ⁹⁷.

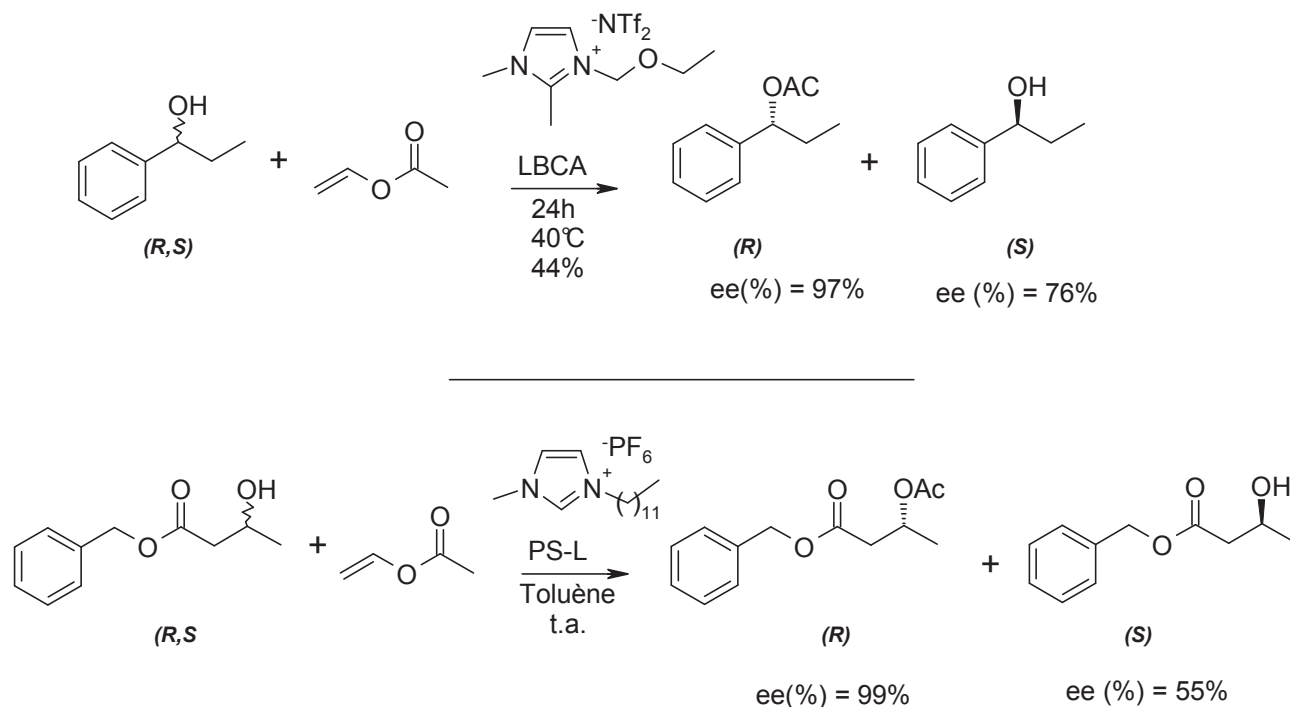


Schéma 28 : Exemples de résolutions d'alcools secondaires biocatalysées par des lipases

La résolution du phénylpropanol en présence de la lipase B de *Candida antarctica* comme catalyseur et un dérivé imidazolium triflimide comme liquide ionique par chauffage classique à 40°C, conduit à l'obtention de l'acétate de phénylpropyle avec un très bon taux de conversion de 44%, et d'un très bon excès énantiomérique (97%).

La lipase de *Pseudomonas cepacia* est également un enzyme idéal pour la résolution d'hydroxybutyrate de benzyle au sein de [BMIM] [PF₆]. Dans ces conditions, la sélectivité est totale pour la configuration (R).

Les bonnes sélectivités et stabilités des lipases en solvant ionique peuvent provenir soit de la préservation de la couche d'eau superficielle à la surface de l'enzyme, soit d'une meilleure stabilisation due à la grande viscosité du liquide ionique ⁹⁸.

⁹⁷ Zhou H., Chen J., Ye L., Lin H., Yuan Y. Enhanced performance of lipase-catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols in monoether-functionalized ionic liquids. *Bioresource Technology*. **2011**, 102, 5562-5566.

⁹⁸ Sheldon R.A., Lau R.M., Sorgedraeger M.J., Rantwijk F., Seddon K.R. Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chemistry*. **2002**, 4, 147-151.

1. Réactions enzymatiques en présence de liquides ioniques sous irradiation micro-onde

Des exemples de réactions enzymatiques menées en milieu non-conventionnel au sein de liquides ioniques sous irradiation micro-onde ont été récemment rapportés dans la littérature. Lors de la transestérification du butyrate d'éthyle en présence de butanol et de LBCA, à 40°C, Baker *et al.* ont montré que l'activité enzymatique dépend du type de liquide ionique utilisé et de la viscosité du milieu (Schéma 29)⁹⁹.

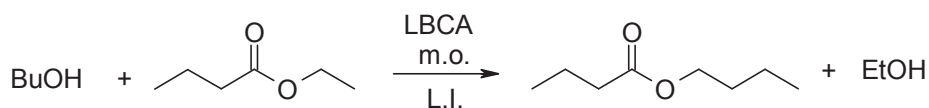


Schéma 29 : Transestérification du butanoate d'éthyle avec le butanol catalysée par des lipases

Il apparaît que les changements de conformation d'un enzyme dans un liquide ionique à forte viscosité sont ralentis. L'enzyme qui est maintenu dans sa conformation native conserve sa stabilité. Cependant, cette viscosité entraîne des limitations au niveau du transfert de la matière.

La nature de l'anion utilisé affecte également l'efficacité de la catalyse. Les anions CH_3COO^- , CF_3COO^- , TFA^- , NO_3^- sont très polaires et peuvent rendre l'enzyme inactif. Ces derniers interagissent fortement à la surface de l'enzyme.

2. Résolution de dérivés amino-phényléthanol

La *O*-acylation énantiosélective du 2-amido-phényléthanol a été réalisée par Lundell en présence de la lipase de *Burkholderia cepacia*, à différentes températures, par chauffage conventionnel ou sous irradiation micro-onde au sein de liquides ioniques de type éthyl-méthyl imidazolium pur ou en mélange avec un solvant organique (Schéma 30)¹⁰⁰.

⁹⁹Zhao H., Baker G.A., Olubako O., Zanders L., Campbell S.M. Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2009**, 57, 149-157.

¹⁰⁰Lundell K., Kurki T., Lindroos M., Kanerva L.T. Room temperature ionic liquids in the kinetic resolution of adrenaline-type aminoethanol by *Burkholderia cepacia* lipase under normal and microwave irradiation. *Advance Synthesis and Catalysis*. **2005**, 347, 1110-1118.

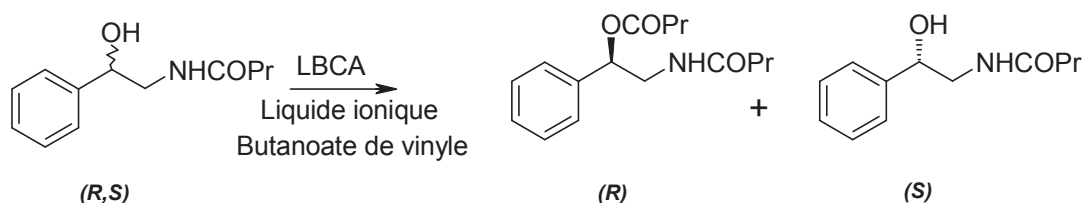


Schéma 30 : Résolution du 2-amino-phényléthanol par la LBCA

La lipase testée reste stable jusqu'à 80°C et est, fortement influencée par le type de solvant ionique (Tableau 7).

Entrée	Solvant	Chauffage	T(°C)	c (%)	t (h)	E
1	TBME	Classique	47	27	1	110
2	TBME	m.o. 60 W	60	46	1	>200
3	TBME	m.o. 90 W	80	51	1	>200
4	EMIM.NTf2	Classique	47	29	2	>200
5	EMIM.NTf2	m.o.90 W	60	23	2	>200
6	EMIM.NTf2/TBME 2:1	Classique	47	33	2	>200
7	EMIM.NTf2/TBME 2:1	m.o. 90 W	60	30	2	>200
8	EMIM.NTf2/TBME 2:1	Classique	80	26	2	110
9	EMIM.NTf2/TBME 2:1	m.o. 90 W	110	2	2	3

Tableau 7 : Acylation d'alcools racémiques par utilisation de la lipase de *Pseudomonas cepacia* en chauffage conventionnel et sous irradiation micro-onde

Les réactions réalisées dans le TBME seul sous micro-onde (entrée 1) affichent une meilleure conversion.

La combinaison liquide ionique/solvant organique sous irradiation micro-onde ne permet pas d'accroître la conversion. A 110°C, sous irradiation micro-onde une forte diminution du ratio énantiomérique est observée, allant jusqu'à une dénaturation complète de l'enzyme (entrée 9).

Lors de cette résolution, le liquide ionique semble avoir un effet activateur sur l'enzyme, mais ne permet pas une stabilisation de la lipase à forte température.

3. Estérification de l'acide lactique

Les esters lactiques sont retrouvés dans une multitude de produits, comme les emballages, les peintures, etc ^{101,102}.

Gubicza a étudié l'estérification de l'acide lactique en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* dans des systèmes liquides ioniques à base cationique phosphorée (Type Cyphos) ou dans des mélanges liquide ionique/éthanol (Schéma 31 et Figure 4) ¹⁰³.

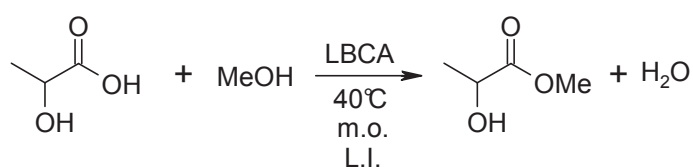


Schéma 31 Estérification de l'acide lactique par la lipase B de *Candida antarctica*

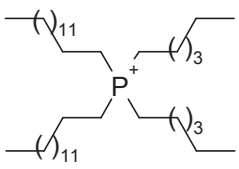
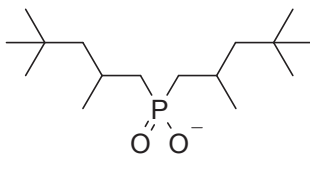
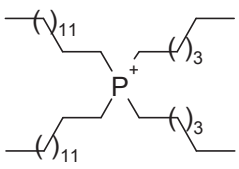
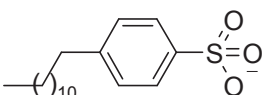
Cation	Anion	Nom
		Cyphos 104
		Cyphos 202

Figure 4 : Structure des liquides ioniques de type Cyphos

Après pré-irradiation de l'enzyme, l'estérification catalysée par la LBCA sous irradiation micro-onde pendant 2 heures peut atteindre les 95% de rendement en présence de Cyphos 202. La réaction peut être menée sous irradiation micro-onde, avec un chargement enzymatique 20 fois inférieur à celui utilisé par chauffage classique. La grande viscosité du liquide ionique conduit à l'utilisation d'un excès d'éthanol afin de fluidifier le mélange. Cependant, ce mélange est délétère pour l'enzyme. Il est à noter que sous micro-onde, ni l'enzyme, ni le liquide ionique ne sont affectés.

¹⁰¹ Zeng J.B., Li Y.D., Zhu Q.Y., Yang K.K., Wang X.L., Wang Y.Z. A novel biodegradable multiblock poly(ester urethane) containing poly(l-lactic acid) and poly(butylene succinate) blocks. *Polymer*.**2009**, 50, 1178-1186.

¹⁰² Pereira C., Silva V., Rodrigues A. Ethyl lactate as a solvent: Properties, applications and production processes – a review. *Green Chemistry*. **2011**, 13, 2658-2671.

¹⁰³ Major, B., Németh, G., Belafi-Bako, K., Gubicza, L. Unique role of water content in enzymatic synthesis of ethyl lactate using ionic liquid as solvent. *Chemical Papers*, **2010**, 64, 261-264.

5. Résolution d'amines

Les lipases sont capables de résoudre non seulement des mélanges racémiques d'alcools secondaires, mais des racémiques d'amines primaires. Les amines primaires énantiopures sont retrouvées dans bon nombre de composés chiraux à visée thérapeutique ¹⁰⁴. L'approche enzymatique pour la résolution d'amines racémiques est une technique d'intérêt car très sélective ¹⁰⁵.

Afin d'augmenter les rendements, la résolution enzymatique peut être couplée, comme précédemment avec la stratégie SKR sous irradiation micro-onde. L'amine n'ayant pas réagi avec la lipase est « racémisée » au biais d'une oxydation puis réduction spécifique.

L'équipe de Parvulescu a réalisé la résolution d'amines benzyliques suivant cette méthode SKR (Schéma 32).

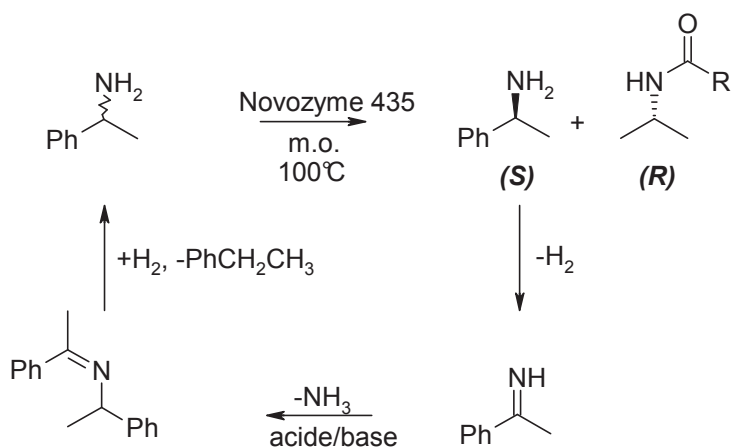


Schéma 32 Résolution dynamique de la 1-phénylamine racémique

Grâce à cette méthode, des rendements *quasi* quantitatifs et des excès énantiomériques supérieurs à 90% ont été obtenus lors de la résolution de la phényléthylamine. Enfin, un excellent taux de conversion de 97% est observé après une heure d'irradiation micro-onde comparé aux 60% de rendement obtenu par chauffage classique ¹⁰⁶.

¹⁰⁴ Patel R. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews*. **2008**, 252, 659-701.

¹⁰⁵ Ditrich K. Optically active amines by enzyme-catalyzed kinetic resolution. *Synthesis*. **2008**, 14, 2283-2287.

¹⁰⁶ Parvulescu A.N., Van der Eycken E., Pacobs P., De Vos D. Microwave-promoted racemization and dynamic kinetic resolution of chiral amines over Pd on alkaline earth supports and lipases. *Journal of Catalysis*. **2008**, 255, 206-212.

6. N-acylation

L'amidification stéréosélective d'hydroxyamine est une réaction d'intérêt pour le chimiste.

Des amides difonctionnalisés amphiphiles potentiellement utilisables comme surfactants biodégradables peuvent être synthétisés par catalyse enzymatique. En effet, le rejet des surfactants dans l'environnement peut entraîner une certaine toxicité¹⁰⁷.

L'équipe de Kidwai a étudié la *O*- et *N*-acylation de divers esters gras en utilisant un composé difonctionnalisés : l'éthanolamine (Schéma 33)¹⁰⁸.

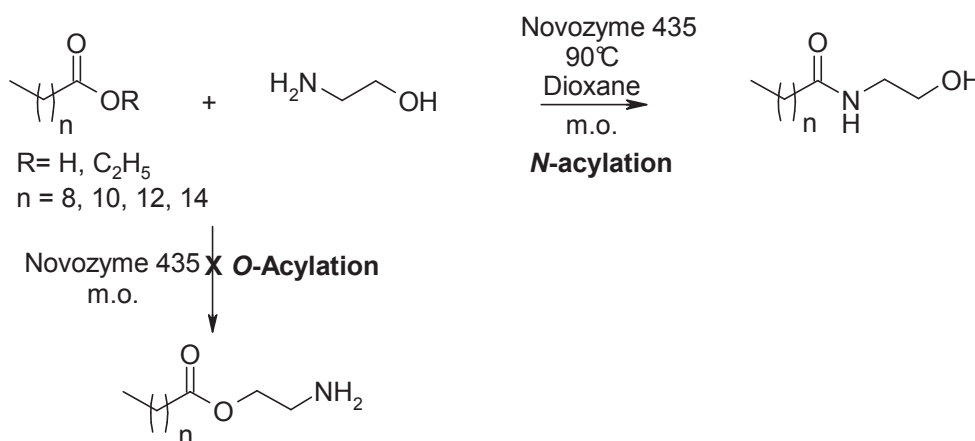


Schéma 33 : Amidification d'acides organiques par le Novozyme 435

La synthèse de ces molécules amphiphiles a été réalisée sous micro-onde en phase solide, afin de conserver une meilleure activité et réutilisabilité enzymatique. Par comparaison au chauffage conventionnel l'augmentation des activités enzymatiques se traduit d'un facteur 10, avec rendement *quasi* quantitatif en 5 minutes d'irradiation. Dans tous les cas de figure, seule la *N*-acylation est observée.

Dernièrement, Le Joubioux a comparé la vitesse de réaction de deux substrats polaires : le butan-2-ol et la *sec*-butylamine lors de l'estérification de l'acide myristique, et ce par chauffage classique (Schéma 34)¹⁰⁹.

¹⁰⁷ Fernández-Pérez M., Otero C. Enzymatic synthesis of amide surfactants from ethanolamine. *Enzyme and Microbial Technology*. **2001**, 28, 527–536.

¹⁰⁸ Kidwai M., Poddar R., Mothsra M. *N*-acylation of ethanolamine using lipase: a chemoselective catalyst. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. **2009**, 5, 10-16.

¹⁰⁹ Le Joubioux F., Achour O., Bridiau N., Graber M., Maugard T. Kinetic study of 2-butanol *O*-acylation and *sec*-butylamine *N*-acylation catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2011**, 70, 108-113.

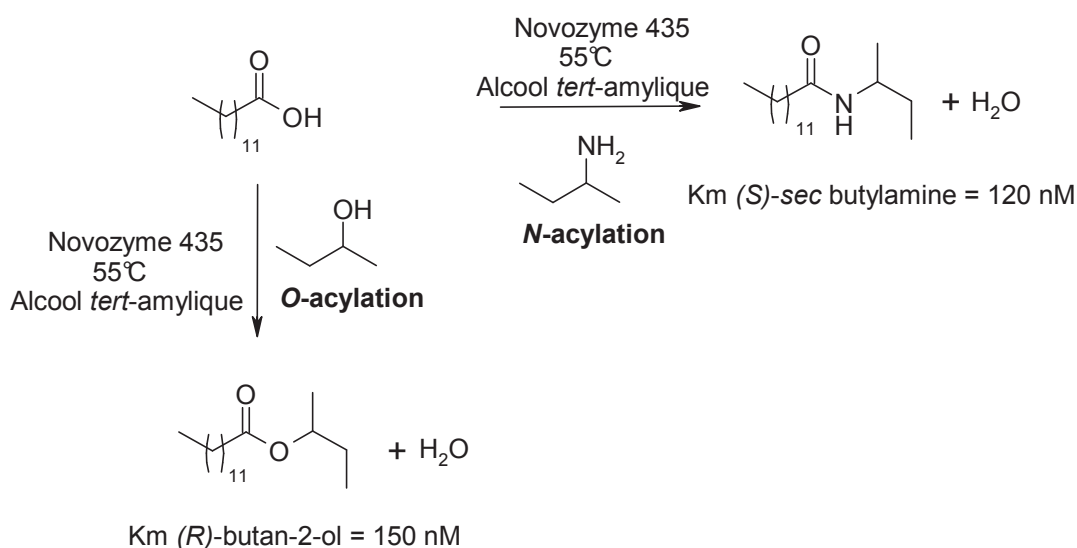


Schéma 34: *N*- et *O*-acylation du butan-2-ol et de la *sec*-butylamine biocatalysée par la lipase B de *Candida antarctica*

L'étude des constantes mickaeliennes a montré que la lipase B de *Candida antarctica* possède une plus grande affinité pour la *O*-acylation que pour la *N*-acylation. Ce résultat, bien que contradictoire avec les travaux de Kidwai, montre que le changement de réaction modèle peut provoquer une modification complète de la stéréosélectivité de la lipase.

7. Calcul des constantes cinétiques

Afin de mieux comprendre l'impact de l'irradiation micro-onde sur le système enzymatique, le calcul des constantes intrinsèques comme les constantes catalytiques de Mickaelis ou de dénaturation est nécessaire.

1. Influence de l'irradiation micro-onde sur la constante catalytique

Lors de l'étude de l'acétylation du citronellol par la lipase B de *Candida antarctica* une augmentation d'activité sous irradiation micro-onde est observée (Schéma 35).

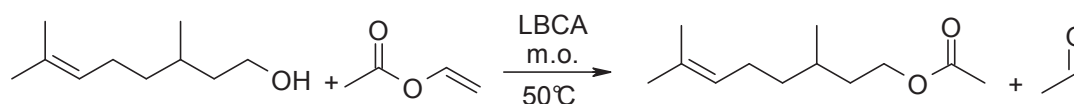


Schéma 35 : Acétylation du citronellol par l'acétate de vinyle

L'équipe de Yadav a démontré que la fréquence catalytique est 190 fois plus élevée sous irradiation micro-onde qu'en chauffage conventionnel. Cette augmentation de la fréquence catalytique est expliquée par une augmentation des collisions des groupements polaires sous irradiation micro-onde, provoquant une meilleure affinité du substrat pour l'enzyme ¹¹⁰.

2. Influence de l'irradiation micro-onde sur la constante de Mickaelis

L'estérification entre l'acide caprylique et le pentanol a été réalisée par Xia *et al.* en utilisant la lipase de *Mucor miehei*, en chauffage classique et/ou sous irradiation micro-onde (Schéma 36).

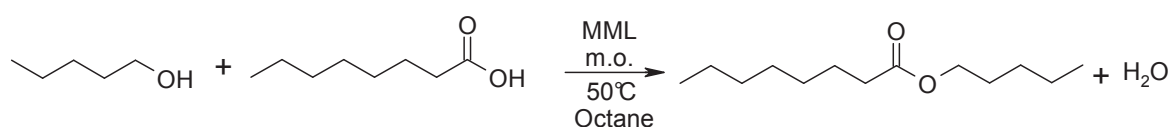


Schéma 36 : Estérification de l'acide caprylique par le pentanol

Les constantes intrinsèques de l'enzyme qui ont été calculées lors de l'estérification sont données dans le tableau 8.

Mode de Chauffage	Constante de Mickaelis (Km)	Valeur
Micro-onde	Pentanol	0,58
Conventionnel	Pentanol	4,15
Micro-onde	Acide caprylique	2,04
Conventionnel	Acide caprylique	1,90

Tableau 8 : Constantes de Mickaelis lors de l'estérification de l'acide caprylique

¹¹⁰ Yadav G.D., Borkar I.V. Kinetic and Mechanistic Investigation of Microwave-Assisted Lipase Catalyzed Synthesis of Citronellyl Acetate. *Industrial Engineering Chemistry Research*. **2009**, 48, 7915-7922.

Sous irradiation micro-onde, une forte augmentation de l'affinité de la lipase de *Mucor miehei* pour le pentanol est observée, comparé au chauffage traditionnel. En revanche, l'affinité pour l'acide caprylique ne semble pas être affectée¹¹¹.

3. Influence de l'irradiation micro-onde sur la dénaturation enzymatique

La dénaturation enzymatique par réaction de transestérification du butanoate d'éthyle par le butanol fut étudiée par Réjasse *et al.* en utilisant de la lipase B de *Candida antarctica* (Schéma 37)¹¹².

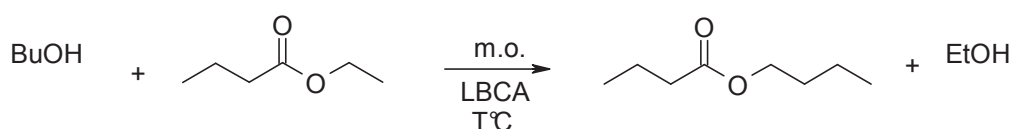


Schéma 37 : Transestérification de l'acétate de butyle par le butanol

Les auteurs ont étudié l'influence de l'irradiation micro-onde sur la stabilité de l'enzyme à 110°C. Par utilisation de la technologie micro-onde en système ouvert (Prolabo S402), ils ont montré que la dénaturation de la lipase varie selon le mode de chauffage. La constante de dénaturation est en effet 1,6 fois plus importante en chauffage classique ($k = 0,67$) à 110°C que par utilisation de l'irradiation micro-onde ($k = 0,41$). Cependant, aucune modification de l'activité de la lipase n'est observée.

Que se soit au niveau de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, de la fréquence réactionnelle ou de la dénaturation enzymatique, l'utilisation de l'irradiation micro-onde provoque chez l'enzyme une bien meilleure activité et stabilité.

8. Limitations

Bien que la technologie micro-onde ait clairement permis de montrer des effets athermiques, c'est-à-dire une augmentation de l'activité et/ou de la sélectivité des lipases sous

¹¹¹ Fang Y., Huang W. Xia Y.M. Consecutive microwave irradiation induced substrate inhibition on the enzymatic esterification. *Process Biochemistry*. **2008**, 43, 306-310.

¹¹² Réjasse B., Lamare S., Legoy M.D., Besson T. Influence of microwave irradiation on free *Candida antarctica* lipase B activity and stability. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2006**, 4, 3703-3707.

irradiation micro-onde non liée à la température, de nombreux cas existent dans la littérature où l'irradiation micro-onde ne possède pas d'effet significatifs.

1. Transestérification du méthylacétoacétate

Leadbeater a reporté en 2007 la transestérification enzymatique du méthylacétoacétate de méthyle (Schéma 44). La réaction a été suivie dans les mêmes conditions que ce soit par chauffage classique ou par irradiation sous champs micro-onde (Schéma 38 et Figure 5) ¹¹³.

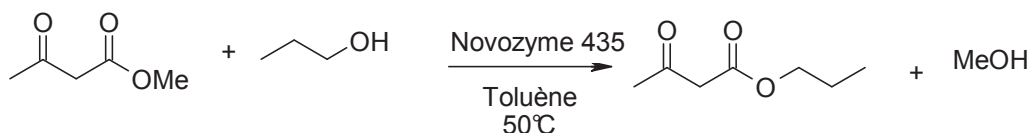


Schéma 38: Transestérification du méthylacétoacétate par le propanol

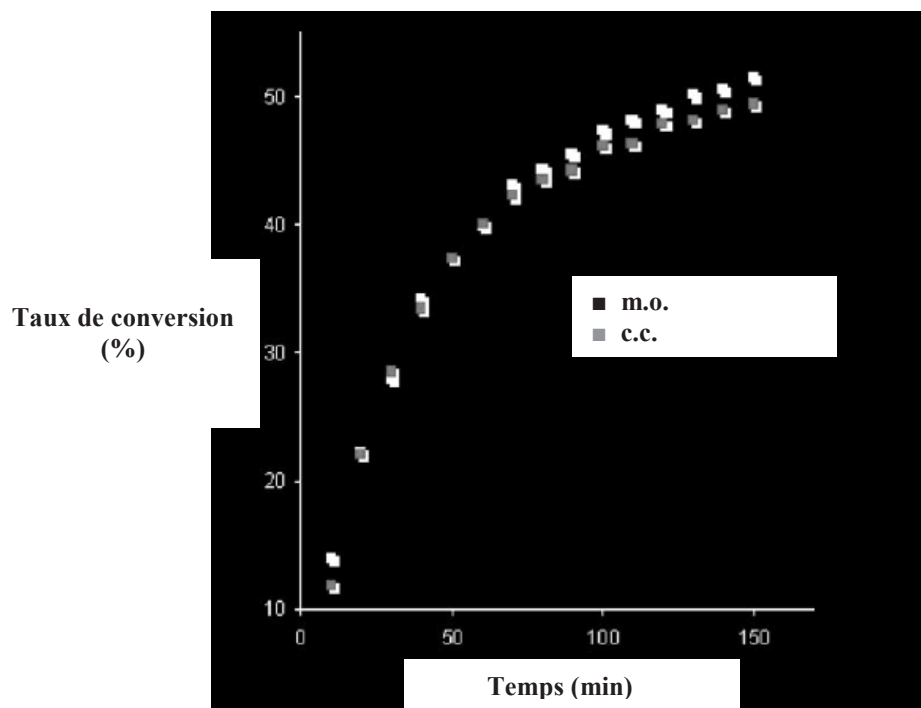


Figure 5: Comparaison entre le chauffage classique et le chauffage par irradiation micro-onde à 50 °C

¹¹³ Leadbeater N., Stencil L., Wood E. Probing the effects of microwave irradiation on enzyme-catalysed organic transformations: the case of lipase-catalysed transesterification reactions. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2007**, 5, 1052-1055.

A la suite du suivi cinétique de la réaction, aucune différence significative n'est observée entre chauffage sous irradiation micro-onde ou chauffage classique.

Cependant, ces résultats sont en désaccord avec ceux trouvés par l'équipe de Yadav¹¹⁴. En utilisant diverses conditions de températures et divers alcools, ils ont clairement mis en évidence des effets athermiques lors de cette réaction.

Pourtant, les conditions opératoires pour ces deux réactions sont très similaires (même quantité de substrat, même température, même micro-onde ou alcool). Cependant, certaines différences sont à noter comme une concentration différente des substrats ou d'enzyme. Ces paramètres pourraient expliquer une telle différence dans ces résultats contradictoires.

2. Résolution du butan-2-ol

La résolution du butan-2-ol a été réalisée en présence de l'acétate d'éthyle en tant que donneur d'acyle et de la LBCA en tant que biocatalyseur (Schéma 39 et Tableau 9)^{9*}.

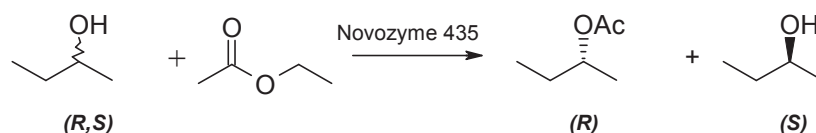


Schéma 39: Résolution du butan-2-ol

Temps (min)	Rdt		
	Monomode	Multimode	Conventionnel
3	4,1	6,5	4,3
5	8,4	14,8	7,7
10	13,6	21,6	14,2
15	19,5	28,8	20,2
20	24,7	31,1	26,9
30	37,1	38,1	37,2

Tableau 9 : Comparaison des rendements obtenus selon les différents modes d'irradiation et en chauffage conventionnel

¹¹⁴ Yadav G.D., Lathi P.S. Synergism between microwave and enzyme catalysis in intensification of reactions and selectivities: transesterification of methyl acetoacetate with alcohols. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*.**2004**, 223, 51-56.

En comparant les rendements obtenus selon les trois modes de chauffage, en four monomode, multimode ou en chauffage classique, aucune différence clairement significative entre les différents rendements n'est observée. Il n'existe donc pas d'effet thermique sur ce modèle réactionnel.

9. Application de la catalyse enzymatique sous irradiation micro-onde pour la synthèse de molécules d'intérêt

Bien que possédant de nombreux avantages dans la synthèse et la résolution de molécules de faible poids moléculaire, il existe très peu de cas de résolutions de composés plus utiles au chimiste organicien, comme des molécules plus volumineuses, ou multi fonctionnalisées.

1. Synthèse de dérivés de l'eleuthérine

Afin de réaliser la synthèse de l'eleuthérine, un inhibiteur de la topoisomérase II, l'équipe de Brimble a intégré une méthode simple de catalyse enzymatique, rapide et efficace pour accéder à ce composé énantiopur *via* un alcool secondaire chiral (**1**)¹¹⁵ (Schéma 40).

¹¹⁵ Sperry J., Lorenzo-Castrillejo I., Brimble M., Machin F. Pyranonaphthoquinone derivatives of eleutherin, ventiloquinone L, thysanone and nanaomycin A possessing a diverse topoisomerase II inhibition and cytotoxicity spectrum. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2009**, 17, 7131-7137.

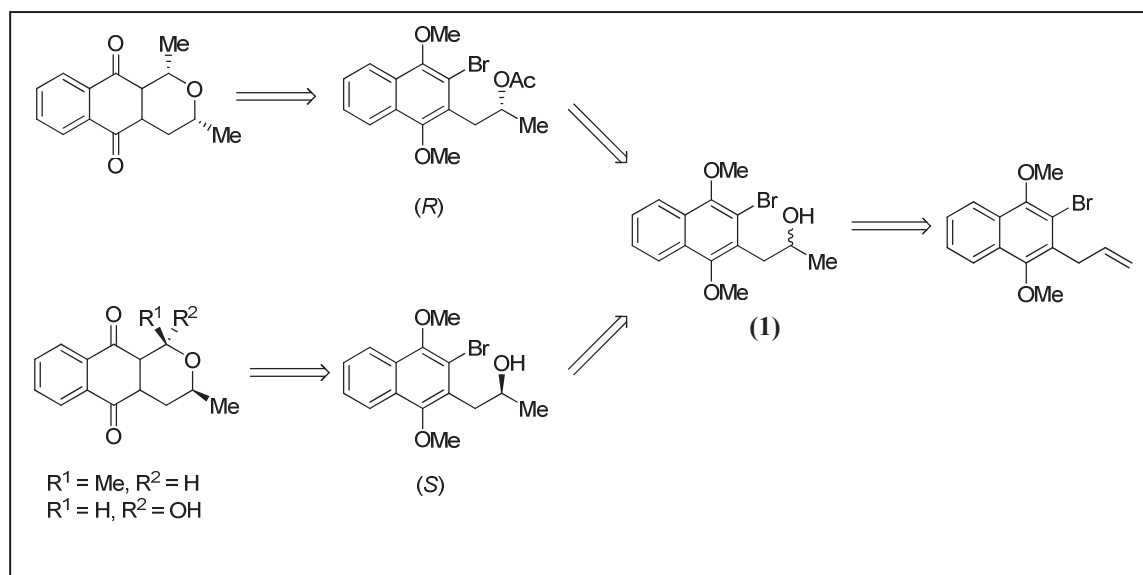


Schéma 40: Rétrosynthèse de la (-)-9-déméthoxyéleuthérine et de la (+)-déméthoxyéleuthérine

La résolution de l'alcool racémique a été réalisée par acétylation sélective ($c = 45\%$) en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme 435), à 60°C sous irradiation micro-onde (70W) pendant 6 heures dans le toluène. Les deux déoxyanalogues de l'éleuthérine ont ainsi été préparés avec un excellent excès énantiomérique de 93%.

Cependant, au départ de l'alcool allylique correspondant, aucun produit n'a pu être obtenu, ni par résolution enzymatique, ni par hydroboration sélective en présence du (+)-allyldiisopinocampénylborane (Schéma 41)¹¹⁶.

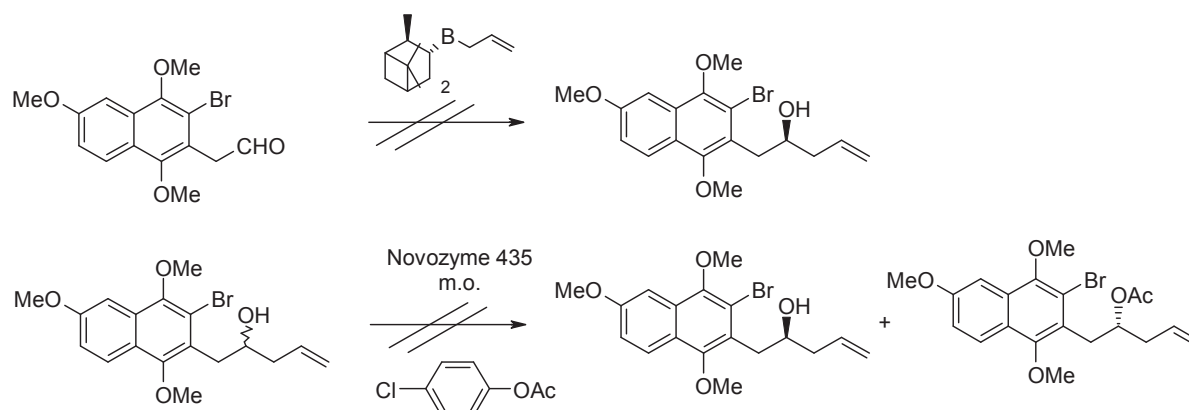


Schéma 41: Différents essais visant à obtenir un précurseur de l'éleuthérine énantiopur

¹¹⁶ Bachu P., Sperry J., Brimble M. Synthesis of a C8 oxygenated pyranonaphthoquinone: a useful precursor to dimeric pyranonaphthoquinones. *Tetrahedron*. **2008**, 64, 3343-3350.

2. Résolution du benzotriazol-2-yl-alcan-2-ol

Lors de la résolution du benzotriazol-2-yl-alcan-2-ol, l'équipe de Loupy a comparé la résolution sous irradiation micro-onde et en chauffage classique, en présence de différents donneurs d'acyle, dans les mêmes conditions (Schéma 42) ¹¹⁷.

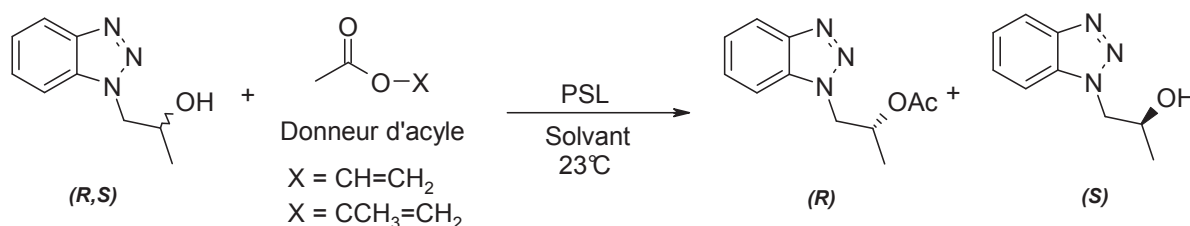


Schéma 42 Tentatives de résolution du benzotriazol-2-yl-alcan-2-ol

Quelles que soient les conditions de températures étudiées (-20 à 80°C), la lipase choisie ou le mode de chauffage, aucun effet non-thermique n'est remarqué sur l'activité de la lipase. Quelques soient les essais, l'enzyme affiche une modeste sélectivité (Tableau 10).

Solvant	Chauffage	c (%)	Ester ee (%)	Alcool ee (%)	E
Toluène	Classique	51	59	62	7
Toluène	m.o. 240 W	55	61	76	9
Sans	Classique	53	63	70	9
Sans	m.o. 240 W	47	68	59	9

Tableau 10 : Comparaison de la résolution du benzotriazol-2-yl-alcan-2-ol par chauffage conventionnel et sous irradiation micro-onde

Bien que l'utilisation d'enzyme sous irradiation micro-onde soit une technique innovante, simple, rapide et proposant toute une gamme de réactions chimiques possibles pour la synthèse de précurseurs chiraux ou pour des molécules à utilités biologiques, la synthèse enzymatique sous irradiation micro-onde est soumise à certaines contraintes liées au micro-environnement de l'enzyme, comme la température, le solvant, le type de réaction mise en jeu, etc.

¹¹⁷ Pchelka B., Loupy A, Petit A. Preparation of various enantiomerically pure (benzotriazol-1-yl)-and (benzotriazol-2-yl)-alkan-2-ols. *Tetrahedron : Asymmetry*. **2006**, 17, 2516-2530.

La moindre modification d'un seul de ces paramètres peut entraîner une complète activation ou désactivation enzymatique, rendant l'optimisation de ce type de réaction très délicate.

Objectifs

Les performances enzymatiques en milieu non conventionnel pour la synthèse de composés chiraux ne sont plus à démontrer. Il est également connu que l'augmentation de la température au sein du milieu réactionnel permet une augmentation de l'activité enzymatique jusqu'à ce que la dénaturation thermique soit supérieure à l'activation. Cette augmentation de température est connue aussi pour diminuer la sélectivité enzymatique, notamment à cause d'une trop grande mobilité de la poche stéréospécifique ou des contraintes entropiques.

L'utilisation de l'irradiation micro-onde permet de réduire de façon considérable les temps réactionnels en synthèse organique.

Cependant, l'association de l'irradiation micro-onde avec la résolution enzymatique est relativement peu répandue, du fait notamment du manque de compréhension de l'impact de l'irradiation sur les systèmes enzymatiques, et des contraintes dans l'utilisation d'enzymes. Pourtant, de nombreux résultats prometteurs ont été observés, permettant de mieux comprendre le rôle de l'irradiation micro-onde sur les lipases.

Des travaux de transestérification du butyrate d'éthyle par le butanol précédemment réalisés au laboratoire mis en évidence différents aspects de l'impact de l'irradiation micro-onde sur la lipase B de *Candida antarctica*.

Suivant les modes de chauffage utilisés (classique ou sous champ micro-onde) au sein d'un milieu sans solvant et ce, entre 50°C et 110°C avec une valeur d' a_w comprise entre 0 et 1, aucune différence significative d'activité de la LBCA n'est remarquée, que ce soit au niveau des constantes d'équilibre ou dans les mesures d'activité. Cependant, l'ajout de 2-méthyl-butan-2-ol comme solvant organique conduit à une augmentation d'activité d'un facteur 1,8 sous irradiation micro-onde.

La stabilité de la lipase varie de façon dépendante de la température sous irradiation micro-onde et en chauffage classique. La thermodénaturation enzymatique est plus rapide sous irradiation micro-onde, excepté à 100°C où l'effet est inversé, ceci pouvant être expliquée par une différence de gradient thermique ou par l'existence de points chauds en début de réaction.

Utilisant le savoir-faire du laboratoire en termes de technologie micro-onde et de synthèse catalysée par des enzymes, l'étude de l'irradiation micro-onde sur la sélectivité et la

Objectifs

conversion de lipase sera entreprise. L'étude de la faisabilité de réaction de biocatalyse sera étudiée notamment dans le cas de réaction d'estérification, de transestérification permettant d'aboutir à des composés chiraux de façon rapide, propre et hautement sélective.

Premièrement, afin de comparer et de montrer la faisabilité de l'irradiation micro-onde, la lipase B de *Candida antarctica* sera utilisée comme catalyseur pour la résolution d'alcools secondaires linéaires plus ou moins encombrés (Schéma 43).

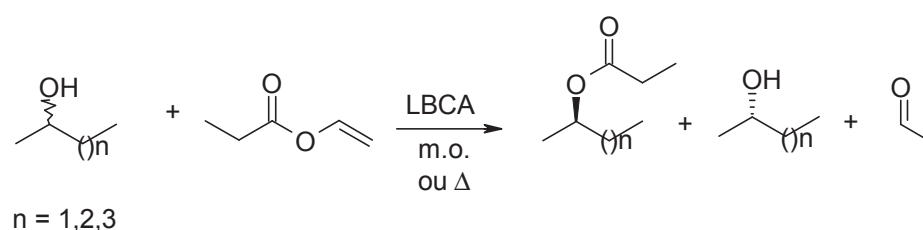


Schéma 43 : Résolution d'alcools secondaires linéaires

Ayant montré la faisabilité de résolution de ces alcools linéaires sous irradiation micro-onde, l'étude de résolution de molécules polyfonctionnalisées plus complexes sera étudiée, comme lors de la résolution du mandélate de méthyle (Schéma 44).

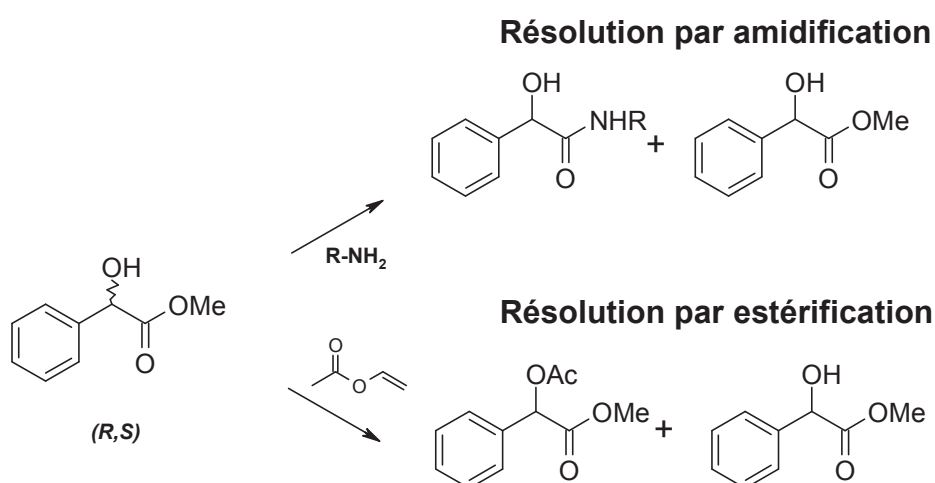


Schéma 44 : Stratégies de résolution du mandélate de méthyle par amidification et estérification en présence de lipases

Afin d'élargir les possibilités de résolution et de mieux comprendre les lipases, une voie de résolution par amidification et par acétylation sera étudiée.

Objectifs

Pour permettre la meilleure optimisation possible, les différents paramètres réactionnels que sont la température, le mode de chauffage, le type de solvant ou le temps d'irradiation seront étudiés.

Nous intéressants à l'impact de l'importance de l'irradiation micro-onde sur le système enzymatique, la comparaison entre mode de chauffage et température sera étudiée dans le cadre de l'acétylation du géraniol catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Schéma 45).

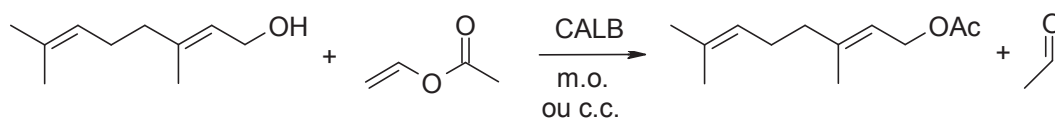


Schéma 45 : Acétylation du géraniol par la lipase B de *Candida antarctica*

La comparaison des temps réactionnels nécessaires nous permettra de mieux appréhender les effets thermiques ou non de la réaction.

De plus, afin de mesurer précisément l'impact de l'irradiation micro-onde sur le système enzymatique lors de la résolution d'alcools secondaires et de l'acétylation du géraniol, une technologie innovante, sera utilisée : l'irradiation sous refroidissement constant, en utilisant la technologie Cool Mate ®.

Enfin, utilisant le savoir-faire du laboratoire dans la résolution d'alcools secondaires, la résolution molécules polyhydroxylées type diols homochiraux par des lipases sera entreprise afin d'accéder à des précurseurs chiraux d'intérêts pour la synthèse d'esters de jasmonates (Schéma 46).

Objectifs

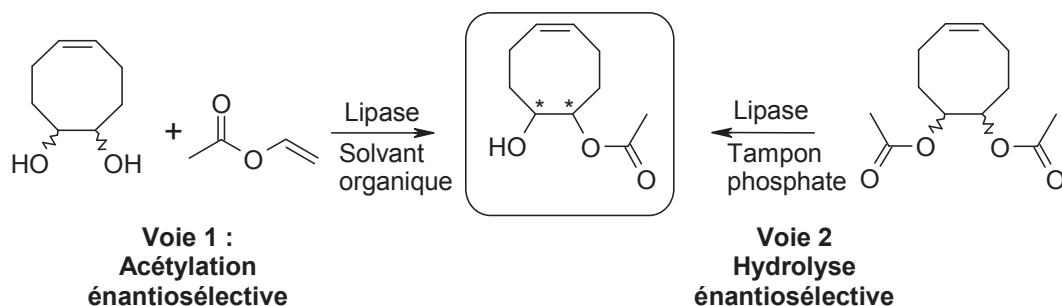


Schéma 46 : Résolution de diols et diacétates homochiraux par utilisation de lipases

La résolution de diols cycliques homochiraux sera tout d'abord étudiée par acétylation énantiosélective ou par hydrolyse en utilisant des lipases. Les paramètres tels que le choix du solvant, ou le temps réactionnel seront étudiés en utilisant des lipases.

Enfin, l'étude de la résolution de triols, molécules polyhydroxylées à haute valeur ajoutée sera été entreprise en utilisant des lipases et des cutinases (Schéma 47).

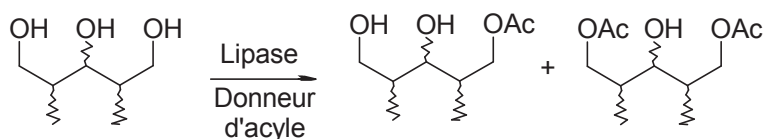


Schéma 47 : Résolution de diol et triol par acétylation énantiosélective enzymatique

Les paramètres réactionnels tels que la température, le choix du solvant ou le mode de chauffage seront étudiés.

Après un chapitre d'introduction consacré à l'état de l'art sur les réactions de biocatalyse, en général, sous irradiation microonde, le second chapitre sera consacré à l'étude de l'irradiation et la pré-irradiation enzymatique. Le troisième chapitre sera dédié à l'étude sous champ micro-onde de la résolution enzymatique d'alcools secondaires linéaires simples non ramifiés et d'alcools secondaires de type α -hydroxyesters. Enfin dans le quatrième chapitre seront détaillés les résultats concernant la résolution de divers polyols d'intérêt (diols homochiraux et 1,3,5-triols) par voie enzymatique sous irradiation microonde. Les protocoles expérimentaux et la description analytique des composés sont rassemblés à la fin de chaque chapitre.

**Chapitre II: Influence de l'irradiation sous champ
micro-onde sur la stabilité et l'activité de lipases**

PARTIE I. Etude comparative de la stabilité enzymatique

Dans toute réaction chimique, il existe un avantage certain à travailler à de fortes températures. D'après la loi d'Arrhenius, la constante de vitesse augmente avec la température. Cependant, dans le cas d'un système enzymatique, à de trop fortes températures, les enzymes peuvent subir une forte dégradation thermique liée à l'altération irréversible des acides aminés de l'enzyme. Le choix de travailler avec un enzyme thermostable est donc capital pour éviter cette dégradation.

Parmi les enzymes thermostables utilisables, les lipases connues pour leur bonne stabilité thermique sont capables de garder une excellente stabilité dans des milieux fortement dénaturants¹¹⁸. Dans la littérature plusieurs exemples montrent la capacité exceptionnelle des lipases à conserver une bonne stabilité thermique.

En conditions classiques, la lipase B de *Candida antarctica* peut être utilisée à des températures au-delà de 100°C. Loupy *et al.* ont montré la grande activité de la lipase B de *Candida antarctica* à 110°C lors de l'acétylation d' α -D-glucoyranoside (Schéma 48)¹¹⁹.

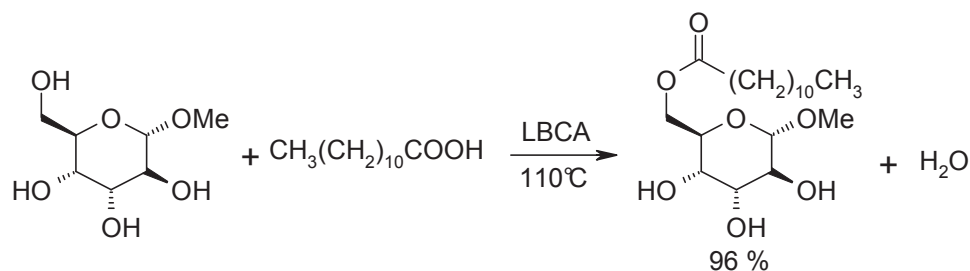


Schéma 48 : Acylation de l'alcool primaire de l' α -D-glucoyranoside par la lipase B de *Candida antarctica* à 110°C

Un excellent rendement de 96 % et une stéréosélectivité totale sont obtenus lors de l'acylation de l'alcool primaire.

¹¹⁸ Ebrahimpour A., Rahman R.N., Basri M., Salleh A.B. High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM. *Bioresource Technology*. **2011**, 13, 6972-6981.

¹¹⁹ Gelo-Pujic M., Guibé-Jampel E., Loupy A., Galema S. Mathé D. Lipase-catalysed esterification of some α -D-glucoyranosides in dry media under focused microwave irradiation. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. **1996**, 1, 2777-2780.

En fluide supercritique, la résolution du phényléthanol a été catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* à des températures supérieures à 140 °C (Schéma 49).

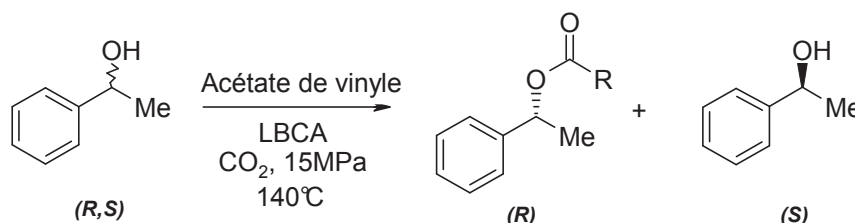


Schéma 49 : Résolution du phényléthanol par la lipase B de *Candida antarctica* à 140°C

A cette température, l'enzyme conserve une activité résiduelle de 10% après 14 heures de réaction. A 160°C, l'enzyme perd toute son activité catalytique¹²⁰.

La lipase B de *Candida antarctica* n'est pas la seule lipase thermostable. En effet, la thermostabilité de la lipase de *Pseudomonas cepacia* a été démontrée à 120°C en chauffage traditionnel lors de la résolution du diphenylpropan-2-ol par l'équipe de Sakai¹²¹.

Dans tous ces cas de figure, l'enzyme est utilisé en milieu non conventionnel pour réduire sa dénaturation thermique par rapport à l'utilisation d'un milieu aqueux conventionnel¹²².

Afin de limiter la dénaturation thermique, la pré-irradiation sous champ micro-onde a été étudiée par B. Réjasse lors de la transestérification du butanoate d'éthyle par le butanol. Une très bonne thermostabilité de la lipase B de *Candida antarctica* a été observée à 100°C (Schéma 50)¹²³.

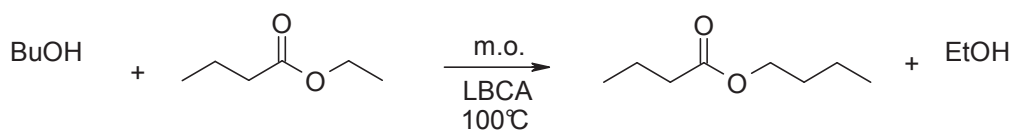


Schéma 50 : Transestérification du butanoate d'éthyle par le butanol sous irradiation micro-onde

¹²⁰ Overmeyer A., Schrader-Lippelt S., Kasche V., Brunner G. Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40 °C to 160 °C in supercritical CO₂. *Biotechnology Letters*. **1999**, 21, 65-69.

¹²¹ Ema T., Kageyama M., Korenaga T., Sakai T. Highly enantioselective lipase-catalyzed reactions at high temperatures up to 120°C in organic solvent. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2003**, 14, 3943-3947.

¹²² Iyer P.V., Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*. **2008**, 43, 1019-1032.

¹²³ Réjasse B., Lamare S., Legoy M.D., Besson T. Stability improvement of immobilized *Candida antarctica* lipase B in an organic medium under microwave radiation. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2004**, 2, 1086-1089.

Par pré-irradiation de l'enzyme dans le butanol à 100°C, il a été montré que la désactivation de l'enzyme est diminuée d'un facteur 6 sous irradiation micro-onde comparé au chauffage classique.

Ces études reposent néanmoins sur la stabilité enzymatique avec ses substrats, et non de l'enzyme isolé.

Afin de mieux appréhender la stabilité thermique de la lipase B de *Candida antarctica* isolée, une étude comparative chauffage classique/irradiation micro-onde a été entreprise. La meilleure compréhension de la stabilité enzymatique devrait nous permettre de mieux cerner les causes des effets non-thermiques d'une réaction.

I. Détermination de la stabilité de la lipase B de *Candida antarctica*

La stabilité enzymatique de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique a été déterminée, sous irradiation micro-onde, par la mesure de son activité résiduelle. L'activité résiduelle de l'enzyme irradié sous champ micro-onde a été comparée à celle en chauffage classique. L'expérience consiste en un chauffage sous champ micro-onde ou en condition classique de la lipase pendant une durée d'une ou deux heures. L'enzyme est ensuite récupéré et un suivi de l'activité lipolytique résiduelle de la lipase est réalisé par titration de l'acide butyrique libéré par hydrolyse de la tributyrine à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium à 100mM.

L'activité résiduelle est décrite comme étant la pente à la droite $\ln(A/A_0)$, où A est l'activité résiduelle à $t = 1$ ou 2 heures et A_0 l'activité native de l'enzyme. La pente de la droite définie sous le terme k (exprimé en min^{-1}) traduit la stabilité enzymatique.

La stabilité de la lipase B de *Candida antarctica* a ainsi été quantifiée à 85°C par chauffage classique et sous irradiation micro-onde. A cette température, la lipase B de *Candida antarctica* conserve une partie de son activité en chauffage classique après deux heures (Figure 6).

Chapitre II : Influence de l'irradiation sous champ micro-onde sur
la stabilité et l'activité des lipases

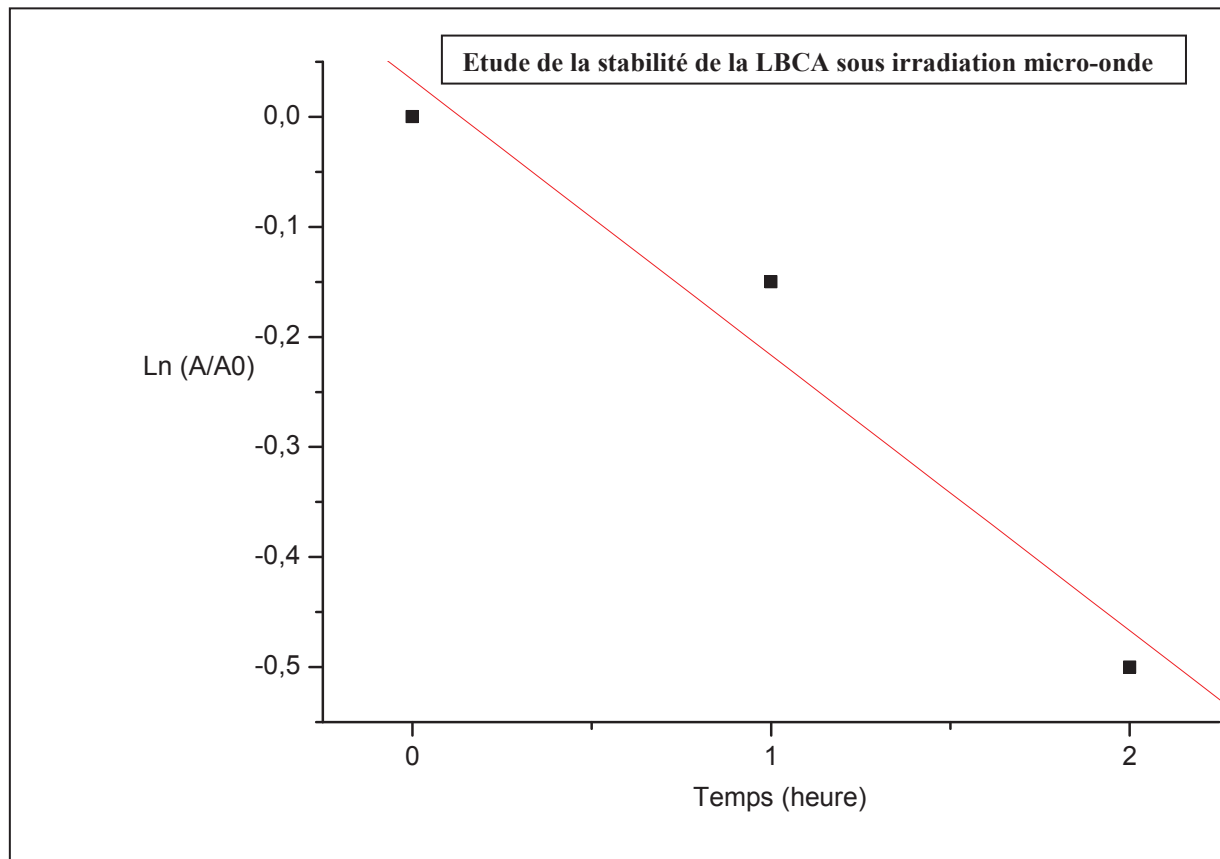


Figure 6 : Mesure de la stabilité de la lipase B de *Candida antarctica* sous irradiation micro-onde.

Après calcul de l'activité résiduelle et détermination du coefficient directeur de la droite $\ln (A/A_0)$, le coefficient k a été calculé puis comparé sous irradiation micro-onde et en chauffage classique (Tableau 11).

Chauffage	Durée (heure)	Activité résiduelle (%)	k
Conventionnel	1	87.3	-0.3
	2	61.9	
Micro-onde	1	85.7	-0.25
	2	57.1	

Tableau 11 : Comparaison de l'activité résiduelle entre le chauffage classique et le chauffage sous irradiation micro-onde à 85°C

Que se soit sous irradiation micro-onde ou par chauffage classique, la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée conserve une bonne partie de son activité catalytique (entre 57 et 62%), même après deux heures de chauffage.

La stabilité enzymatique retrouvée est similaire sous irradiation micro-onde ou par chauffage classique pour cette température. L'irradiation micro-onde ne semble, dans ce cas, pas jouer de rôle sur la stabilité enzymatique en irradiant la lipase seule.

Etant donné que la stabilité enzymatique par irradiation de l'enzyme seul est similaire en chauffage classique et sous irradiation micro-onde, l'augmentation de l'activité et de la sélectivité de l'enzyme, couramment observée sous irradiation micro-onde ne semblent donc pas être dues à la stabilité de l'enzyme seul.

Afin de poursuivre cette étude et de déterminer des possibles effets thermiques, nous nous sommes focalisés sur l'étude d'une réaction modèle, en comparant les paramètres réactionnels en chauffage classique et sous irradiation micro-onde.

PARTIE II. Détermination d'effets non-thermiques lors de l'acétylation du géraniol en chauffage classique et sous irradiation micro-onde par utilisation de la lipase B de *Candida antarctica*

Par emploi de systèmes enzymatiques, une hausse spectaculaire d'activité et/ou de sélectivité peut être observée sous champ micro-onde comparé au chauffage traditionnel, causant des effets non liés à la température appelés effets non thermiques¹²⁴. Toutefois, ces effets sont très controversés, du fait notamment du contrôle de la montée en température qui diffère entre chauffage classique et chauffage sous irradiation micro-onde. La formation de points chauds sous champ micro-onde, peut entraîner de forts gradients de températures ou de fortes pressions locales résultant de la rapide vaporisation des substrats/solvants.

¹²⁴ Rouillard H., Chérouvrier J.R., Thiéry V. Ultrasound and Microwave: Recent Advances in Organic Chemistry. 2011, in press, Chapter 6: Biocatalysis under microwave irradiation. ISBN: 978-81-7895-532-2.

Afin de mieux appréhender les phénomènes régissant l'activité de lipases, une étude comparative entre différents modes de chauffage (classique ou sous irradiation micro-onde) a été réalisée dans le cadre de l'acétylation du géraniol.

I. Intérêt biologique de l'acétate de géranyle

Le géraniol (3,7-diméthyl-octa-*trans*-2,6-diène-1-ol) est un alcool terpénique extrait de nombreuses huiles essentielles. Il possède des propriétés biologiques diverses, comme anti-oxydant, anti-parasitaire ou insecticide ¹²⁵. L'acétylation de la fonction alcool primaire conduit à la formation de l'acétate de géranyle présent à 3.5% dans l'huile essentielle de *Citrus reticulata* (mandarinier commun). Cette huile essentielle possède des propriétés antifongiques sur des champignons comme *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum* et *Helminthosporium oryzae*, avec des concentrations minimales de 0.2mL/100mL. Cette huile essentielle pourrait être utilisée en tant qu'alternative de choix aux antifongiques synthétiques ¹²⁶. L'action antifongique de l'acétate de géranyle a également été retrouvée dans l'huile de feuilles d'*Alpinia conchigera* sur *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, avec des concentrations minimales de 2.5 µg/µL.

La synthèse de l'acétate de géranyle au départ du géraniol par catalyse assistée par des lipases a été largement décrite dans la littérature ^{127,128}. Cependant, à notre connaissance, aucune publication ne fait état de cette réaction sous irradiation micro-onde.

Afin de comparer l'acétylation du géraniol par différents modes de chauffage sous irradiation micro-onde en système ouvert ou en système fermé, les paramètres réactionnels tels que la température, le mode de chauffage ou la durée de réaction ont été étudiés et ce,

¹²⁵ Chen W., Viljoen A.M. Geraniol : A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*, **2010**, 76, 643–651.

¹²⁶ Chutia M., Deha Bhuyan P., Pathak M.G., Sarma T.C., Boruah P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology*. **2009**, 42, 777-780.

¹²⁷ Peres D.R., Da Silva M.G., Barreiros S. Water activity effects on previous geranyl acetate synthesis catalysed by Novozym in supercritical ethane and in supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 1884-1888.

¹²⁸ Martins A., Graebin N., Lorenzoni A., Fernandez-Lafuente R., Ayub M., Rodrigues R. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. *Process Biochemistry*. **2011**, 46, 2311-2316.

pour nous permettre d'affirmer ou d'infirmer un véritable effet du champ micro-onde sur la réaction.

II. Acétylation du géraniol catalysée par la lipase B de *Candida antarctica*

1. Comparaison de l'acétylation entre chauffage classique, chauffage sous irradiation micro-onde en système ouvert et en système fermé

Afin de déterminer d'éventuels effets thermiques de réaction, la synthèse de l'acétate de géranyle par transestérification en présence de la lipase B de *Candida antarctica* a été comparée sous irradiation micro-onde par différents modes de chauffage en système ouvert (CEM Discover), en système fermé (Biotage Initiator) et en chauffage classique. La réaction a été conduite en absence de solvant, en utilisant un léger excès d'acétate de vinyle (1,5 équivalents) et 7 mg de lipase B de *Candida antarctica* (700U) (Schéma 51).

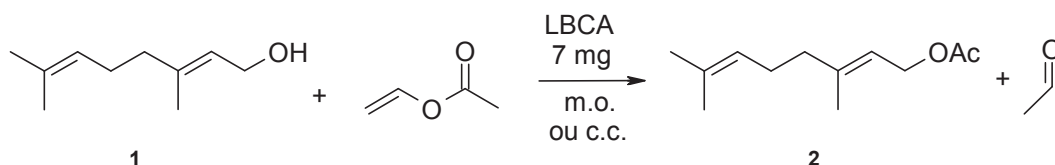


Schéma 51 : Acétylation du géraniol par utilisation de la lipase B de *Candida antarctica* sous irradiation micro-onde ou par chauffage classique

La réaction a été arrêtée après consommation totale du géraniol (1). Les résultats obtenus à 50°C, 75°C et 100°C selon les modes de chauffages sont présentés dans le tableau 12.

Entrée	Température (°C)	Chauffage conventionnel		Micro-onde système ouvert			Micro-onde système fermé		
		Temps (min)	Rdt (%)	Temps (min)	Puissance (W)	Rdt (%)	Temps (min)	Puissance (W)	Rdt (%)
1	50	105	99	60	100	100	30	20	98
2	75	90	97	50	123	99	45	30	98
3	100	70	100	50	150	97	50	50	99

Tableau 12 : Temps réactionnels observés pour une conversion totale du géraniol en fonction de la température

Pour toutes les conditions testées, la catalyse est totale quels que soient les températures et les modes de chauffage appliqués.

- Comparaison entre chauffage classique et sous irradiation micro-onde

Pour obtenir un rendement quantitatif, les temps nécessaires en chauffage sous irradiation micro-onde sont inférieurs à ceux obtenus en chauffage classique. Par exemple à 50°C (entrée 1), l'acylation du géraniol passe de 105 minutes par chauffage conventionnel à seulement 30 minutes sous irradiation micro-onde en système fermé. Cette forte augmentation d'activité sous champ micro-onde peut être due à un effet non thermique de la réaction provoqué par une chance augmentée de collisions entre les groupements polaires du géraniol et ceux de la lipase.

- Comparaison entre chauffage sous irradiation micro-onde en système ouvert et fermé

Pour les deux modes de chauffage sous irradiation micro-onde à une température imposée, on observe une grande disparité des profils de puissance délivrée par les appareillages. Une puissance de 20 watts est nécessaire pour maintenir une température de

50°C en système fermé alors qu'une puissance de 100 watts est affichée en système ouvert. Ces puissances relativement faibles pour ces deux modes de chauffage sont explicables par la polarité du milieu réactionnel. Effet, sans ajout de solvant polaire, la montée en température du milieu réactionnel est uniquement liée à la polarité des substrats, qui sont tous les deux moyennement polaires.

Les temps réactionnels obtenus selon la température fixée sont également variables.

- A 50 °C, l'utilisation du four micro-onde en système fermé s'avère deux fois plus efficace qu'en système ouvert. En utilisant l'irradiation micro-onde en système fermé, seulement 30 minutes de réaction sont nécessaires pour l'obtention complète de l'acétate de géranyle alors que le double est demandé en irradiation en système ouvert.

-Au delà de 50°C, des temps réactionnels similaires sont observés entre irradiation en système ouvert et irradiation en système fermé.

En conséquence, la qualité de la biocatalyse est non seulement dépendante de la température appliquée, mais aussi du type de chauffage employé. L'utilisation de l'irradiation micro-onde aboutit ici toujours à une augmentation significative de l'activité enzymatique comparée au chauffage classique. On peut donc vraisemblablement penser à un effet non thermique de la réaction. Cet effet est plus ou moins prononcé par utilisation d'un micro-onde en système ouvert ou fermé. On pourrait penser qu'une agitation des groupements polaires des substrats et/ou de la lipase pour activer l'enzyme.

Pour toutes les conditions testées, que ce soit en chauffage classique ou sous irradiation micro-onde, la lipase B de *Candida antarctica* est parfaitement exploitable, même à 100°C pendant 70 minutes.

Il est cependant connu dans la littérature que cet enzyme peut supporter des températures bien plus importantes jusqu'à 140 °C en milieu CO₂ supercritique¹²².

2. Comportement de la lipase à plus hautes températures

Afin de déterminer si la lipase B de *Candida antarctica* est capable de travailler à des températures plus importantes dans cette réaction modèle, le comportement de l'enzyme sur une gamme de température plus élevée entre 100 et 150 °C a été étudié.

Etant donné la vaporisation importante de l'acétate de vinyle ($T_{eb} = 72^{\circ}\text{C}$), les acétylations ont été réalisées sous irradiation micro-onde en système fermé (Tableau 13). Après 50 minutes d'irradiation, correspondant à l'acétylation complète du géraniol à 100°C, la réaction a été stoppée et les produits de réaction ont été analysés.

Température (°C)	Rdt (%)	Temps (min)	Puissance (W)	Pression libérée (bar)
100	99	50	50	1
125	62	50	115	2
150	28	50	150	4

Tableau 13 : Acétylation du géraniol en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* sous irradiation micro-onde système fermé entre 100 et 150°C

Dans toute la gamme de température, la lipase conserve une certaine activité, qui est, comme on pouvait s'y attendre décroissante avec la température.

A 125 °C, la lipase B de *Candida antarctica* conserve une activité satisfaisante, avec 62 % d'acétate de géranyle formés en 50 minutes. Ce rendement chute néanmoins à 28 % à 150°C pour une même durée réactionnelle. Cette chute drastique de rendement semblerait être due à une dégradation thermique de l'enzyme.

Au-delà de ces températures, entre 150°C et 200°C, une forte dégradation de l'enzyme est remarquée, avec un brunissement conséquent. Les nombreux sous-produits observés sur CCM nous laissent penser à une lyse de l'enzyme et une dégradation des substrats.

On peut également supposer qu'une vaporisation importante de l'acétate de vinyle peut se produire à cette température, menant à une moins grande disponibilité du substrat pour l'enzyme.

Il est à noter qu'aucun produit estérifié n'est observé sans ajout de lipases à ces températures.

3. Mesure de la dégradation enzymatique sous forte température

D'après les résultats précédents, lors de l'acétylation du géraniol par la lipase B de *Candida antarctica* à 150°C, une forte perte d'activité de l'enzyme est observée. Cette chute de rendement peut être due à deux facteurs :

- soit à une dégradation irréversible des acides aminés de l'enzyme,
- soit à un changement de conformation de l'enzyme pouvant être réversible ou non.

Un changement de conformation enzymatique irréversible sous irradiation micro-onde a déjà été observé par fluorescence et dichroïsme circulaire chez la S-adénylhomocystéine hydrolase et chez la 5'-methylthioadénosine phosphorylase pour une irradiation de 10,5 GHz¹²⁹.

Afin de savoir si la dénaturation enzymatique est réversible dans le cas de l'acétylation du géraniol à 150°C par la LBCA a été irradiée sous irradiation micro-onde à une forte température (150°C), en présence de ses substrats, pendant différentes durée réactionnelles.

La lipase a ensuite été récupérée par filtration, séchée à l'argon et irradiée une seconde fois dans une réaction témoin (75°C, 45 minutes sous irradiation en système fermé). En temps normal, l'enzyme est capable de catalyser de façon complète le géraniol en 45 minutes à 75°C sous irradiation micro-onde en système fermé (Figure 7).

¹²⁹ Porcelli M., Cacciapuoti G., Fusco S., Massa R., d'Ambrosio G., Bertoldo C., De rosa M., Zappia V. Non-thermal effects of microwaves on proteins: thermophilic enzymes as model system. *FEBS Letters*. **1997**, 402, 102-106.

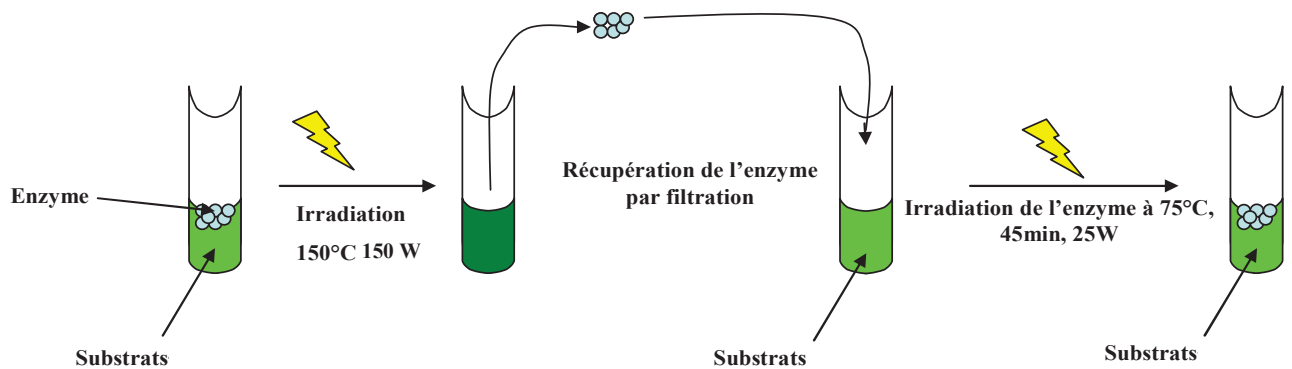


Figure 7 : Pré-irradiation de l'enzyme à 150 °C entre 0 et 120 min et analyse de l'activité résiduelle sur l'acétylation du géraniol

Dans le cas d'une dénaturation réversible, l'activité enzymatique native de la lipase reconditionnée devrait être retrouvée en la faisant réagir dans un milieu propice à l'acétylation du géraniol. Si la dénaturation est irréversible, et donc que l'intégrité de l'enzyme est modifiée, la lipase ne sera plus capable de catalyser le géraniol à 75°C.

Après avoir irradié la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée à 150°C à différents temps réactionnels, les rendements de la réaction témoin ont été déterminés (Tableau 14).

Temps de pré-irradiation à 150°C (min)	Rendement (%)
0	24
5	21
15	17
30	13
60	9
120	7

Tableau 14 : Rendements après purification obtenus en fonction du temps de pré-irradiation enzymatique

Même dans un temps de pré-irradiation très court, l'enzyme perd en grande partie son activité catalytique. Plus le temps de pré-irradiation de l'enzyme à 150°C est important, plus les rendements retrouvés sont faibles. Dans tous les cas, la simple montée en température (t = 0 min) de la réaction suffit à dégrader l'enzyme de manière irréversible.

L'étude sur l'acétylation du géraniol par la lipase B de *Candida antarctica* a permis de mettre en avant la parfaite thermostabilité de cette lipase, jusqu'à 100°C, avec cependant une

tendance ne suivant pas la loi d'Arrhenius. En effet, l'augmentation de la température diminue l'activité catalytique de l'enzyme au lieu de l'augmenter.

La catalyse du géraniol par la lipase B de *Candida antarctica* pour cette réaction modèle est accélérée sous irradiation micro-onde comparée au chauffage classique. Cet effet pourrait être dû à un effet non thermique de réaction, probablement lié à l'augmentation de chance de collision entre les différents groupements polaires de l'enzyme et des substrats.

Cette lipase se comporte aussi différemment selon le mode de chauffage étudié : à 50°C, l'activité de la lipase B de *Candida antarctica* est plus élevée sous irradiation micro-onde en système fermé qu'en système ouvert. Cette grande différence d'activité pourrait être liée à la différence de puissance d'irradiation appliquée et à la méthode d'irradiation utilisée.

Pour discriminer le facteur irradiation du facteur température, il est nécessaire de comparer la puissance d'irradiation sur un même four micro-onde. Pour cette raison, nous avons envisagé de recourir à la technologie Cool Mate[®] qui pourrait nous permettre d'étudier l'impact de la puissance d'irradiation sur le système enzymatique à une température donnée.

PARTIE III. Etude de l'influence de la puissance d'irradiation sur différents exemples de catalyses assistées par des lipases

L'impact de la puissance d'irradiation sur un système enzymatique est à ce jour encore très mal connu. Peu de publications font état de biocatalyses en modulant la puissance d'irradiation. Il existe néanmoins certains exemples traitant de la modulation de la puissance d'irradiation sur un système enzymatique mais avec pour conséquence un changement de température au sein du milieu réactionnel^{130,131}.

Le principal problème quant à l'étude de la puissance d'irradiation est de maintenir le système à une température fixée tout en augmentant la puissance d'irradiation. En pratique, à moins d'utiliser des solvants et des substrats avec une $\tan(\delta)$ très faible, il est très difficile de moduler la puissance d'irradiation sans faire varier de façon importante la température du milieu.

¹³⁰ Pchelka B.K., Loupy A., Plenkiewicz J., Blanco L. Resolution of racemic 1-azido-3-aryloxy-2-propanols by lipase-catalyzed enantioselective acetylation. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2000**, 11, 719-2732.

¹³¹ Shuang Lin S., Yun D., Qi D., Deng C., Li Y., Zhang X. Novel microwave-assisted digestion by trypsin-immobilized magnetic nanoparticles for proteomic analysis. *Journal of Proteome Research*. **2008**, 7, 1297-1307.

Pour maintenir une température fixée au sein du milieu en utilisant tout type de solvant ou de substrat, nous avons utilisé la technologie Cool Mate[®], qui pourrait nous permettre de mieux appréhender le comportement de lipase sous forte irradiation, et ce, de manière inovante.

Ce système de réfrigération repose sur l'utilisation un liquide cryogénique perfluoré n'absorbant pas les micro-ondes et qui est refroidi par de la carboglace ou par de l'azote liquide. Ce liquide circulant autour du milieu réactionnel va abaisser sa température. Pour maintenir une température imposée, le micro-onde va compenser cette perte de température par une augmentation de l'irradiation. En conséquence, en contrôlant la température du liquide cryogénique, il est possible de contrôler la puissance de l'irradiation micro-onde (Schéma 52).

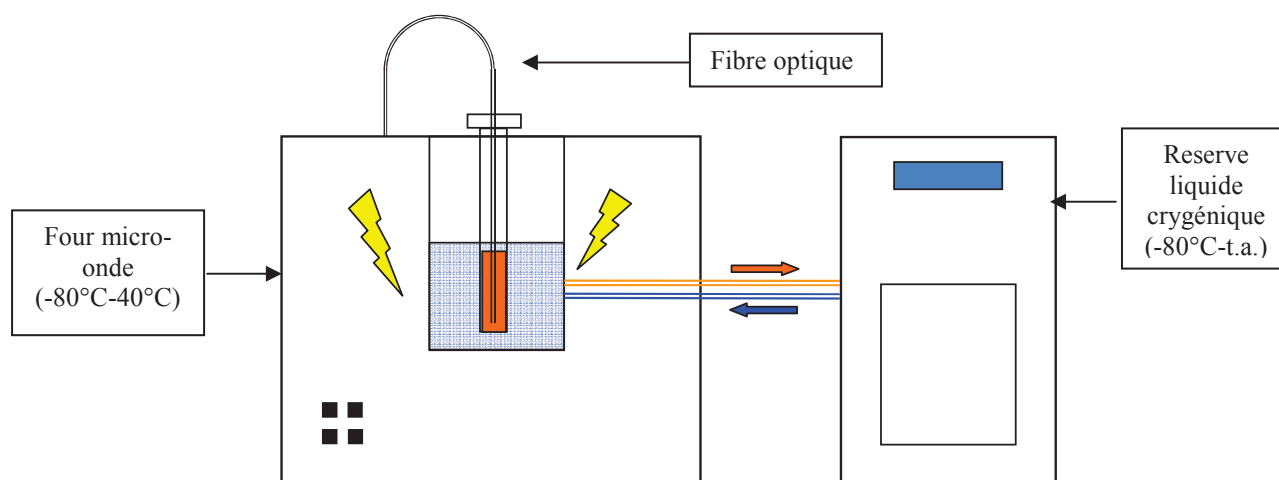


Schéma 52 : Structure du Cool Mate[®]

Ce système de refroidissement constant a tout d'abord été utilisé lors de l'acétylation du géraniol.

I. Influence de la puissance d'irradiation sur l'acétylation du géraniol

L'acétylation du géraniol par utilisation de la lipase B de *Candida antarctica* conduit à d'excellents rendements, que ce soit en conditions classiques ou par chauffage sous irradiation micro-onde.

*Chapitre II : Influence de l'irradiation sous champ micro-onde sur
la stabilité et l'activité des lipases*

Pour mieux comprendre l'influence de la puissance d'irradiation lors de l'acétylation du géraniol, la lipase B de *Candida antarctica* a été irradiée à différentes puissances d'irradiation entre 10 et 300W tout en maintenant une température au sein du milieu fixée à 35°C (Schéma 53 et Tableau 15). Sans refroidissement constant (Cool Mate[®]), le géraniol est complètement catalysé par la lipase en 45 minutes à cette température.

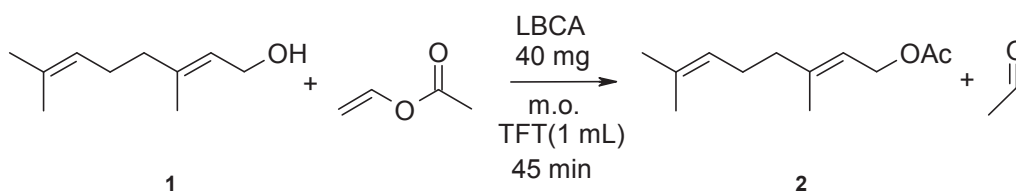


Schéma 53 : Acétylation du géraniol par la lipase B de *Candida antarctica*

Température (°C)	Puissance (W)	Rdt (%)
35	10	97
35	57	96
35	81	95
35	160	91
35	235	92
35	300	86

Tableau 15 : Résultats obtenus lors de l'acétylation du géraniol à 35°C en utilisant la lipase B de *Candida antarctica*

En augmentant la puissance d'irradiation une légère baisse de 11% de rendement est observée, les rendements passant de 97% à 86%. L'augmentation de la puissance d'irradiation se traduirait ici par une augmentation des chances de collision entre les groupements polaires de la lipase B de *Candida antarctica* ou de ses substrats. Cette agitation moléculaire déstabiliserait l'enzyme et ainsi provoquerait une baisse d'activité.

Une faible irradiation micro-onde est donc ici nécessaire pour assurer une meilleure catalyse enzymatique, c'est-à-dire fournir assez d'énergie à l'enzyme pour catalyser le substrat sans toutefois modifier la configuration spatiale des acides aminés clés de l'enzyme.

Il est cependant difficile de généraliser cet effet de l'irradiation micro-onde sur une seule réaction modèle. Afin de vérifier si la même tendance est observée sur d'autres types de

réactions, nous avons décidé d'étudier l'impact de la puissance d'irradiation sur la résolution de l'hexan-2-ol.

II. Influence de la puissance d'irradiation sur la sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica*

La résolution de l'hexan-2-ol a été choisie du fait de la sélectivité *quasi*-totale de la lipase B de *Candida antarctica* pour le substrat de configuration (*R*) que ce soit en chauffage sous irradiation micro-onde ou par chauffage classique^{132,55}. La résolution a été conduite en maintenant une température fixée à 35°C au sein du trifluorotoluène sur une durée de 60 minutes (Schéma 54).

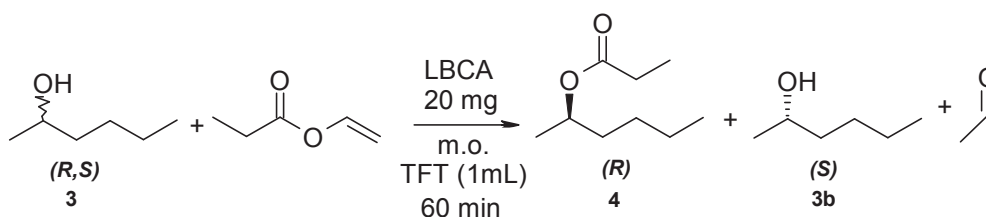


Schéma 54 : Résolution de l'hexan-2-ol par la lipase B de *Candida antarctica*

Une puissance entre 70 W et 300 W a été appliquée au milieu réactionnel. Après analyse des milieux par chromatographie en phase gazeuse, on obtient les résultats suivants : (Tableau 16).

Température (°C)	Puissance (W)	Rdt (%)	Ester ee _p (%)
35	70	14	98,7
35	140	20	98,9
35	250	22	98,9
35	300	39	99,0

Tableau 16 : Etude de la puissance d'irradiation lors de la résolution de l'hexan-2-ol par la lipase B de *Candida antarctica*

¹³² Wang Y., Wang R., Li Q., Zhang Z., Feng Y. Kinetic resolution of rac-alkyl alcohols via lipase-catalyzed enantioselective acylation using succinic anhydride as acylating agent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2009**, 56, 142-145.

L'augmentation de l'irradiation micro-onde entre 70 et 300 W se traduit par une hausse significative de la conversion en ester (4) d'un facteur 2,8. Cette augmentation n'est pas corrélée avec une baisse de sélectivité. Celle-ci reste excellente et similaire pour toutes les puissances d'irradiation appliquées.

Dans ce cas de figure, la puissance d'irradiation semble avoir un effet activateur pour l'enzyme sans pour autant diminuer sa sélectivité.

L'exploitation de fortes puissances d'irradiation pour augmenter l'activité enzymatique a été réutilisée pour la synthèse de précurseurs chiraux d'intérêt biologique de types α -hydroxyesters et α -hydroxyamide.

Nous nous sommes ainsi intéressés à la résolution du mandélate de méthyle, un alcool secondaire de type α -hydroxyester précurseur important de molécules chirales d'intérêt. La résolution catalysée par des lipases sous micro-onde a été envisagée par amidification et par acétylation (Schéma 55).

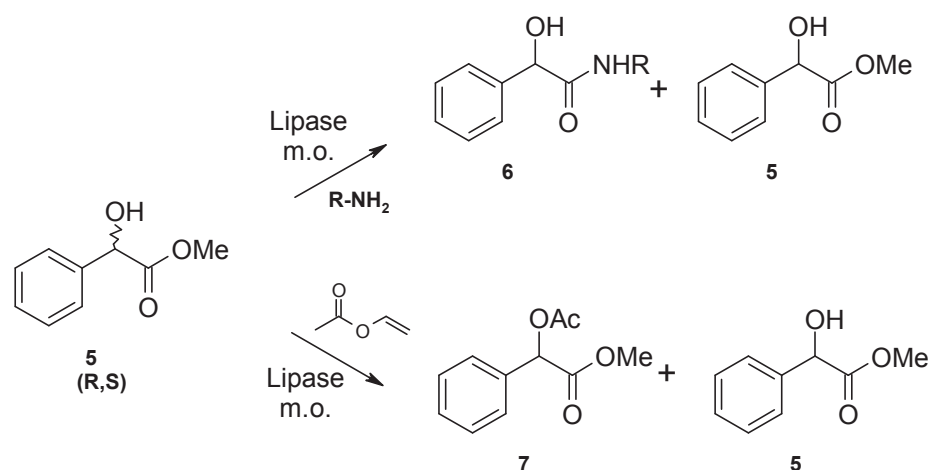


Schéma 55 : Résolution du mandélate de méthyle catalysée par des lipases

1. Influence de la puissance d'irradiation sur l'amidification du mandélate de méthyle

La résolution du mandélate de méthyle par amidification a tout d'abord été conduite en présence d'allylamine et de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée à 30 °C pendant une heure sous forte irradiation (300 W) (Schéma 56).

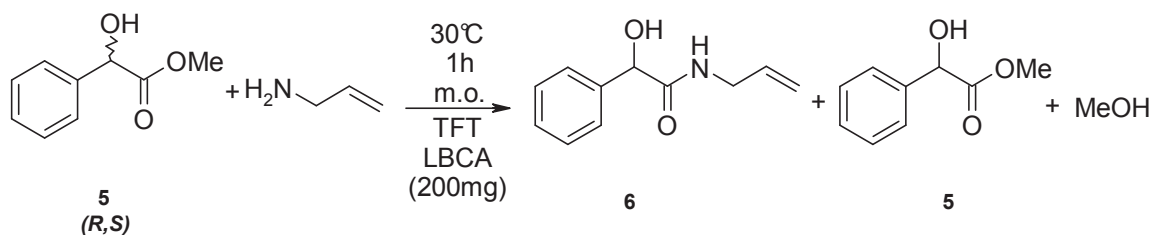


Schéma 56 : Amidification du mandélate de méthyle sous irradiation micro-onde tout en refroidissant le milieu

Les différents modes de chauffage, entre micro-onde en système ouvert avec ou sans refroidissement constant ont été comparés. En refroidissement constant, une forte irradiation de 300 watts a été appliquée (Tableau 17).

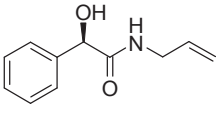
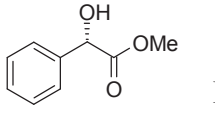
Mode d'irradiation	T (°C)	Puissance (W)	c (%)	 (R)-amide ee (%)	 (S)-ester ee (%)	E
m.o. système ouvert sans refroidissement	30	20	34	12	23	1,8
m.o. système ouvert avec refroidissement	30	300	7	9	22	1,8

Tableau 17 : Comparaison entre deux puissances d'irradiation sur l'amidification du mandélate de méthyle en utilisant la lipase B de *Candida antarctica*

A faible ou forte puissance d'irradiation, l'énantiopréférence de la lipase B de *Candida antarctica* n'est pas modifiée, elle réalise la réaction d'amidification avec une préférence pour le (R)-mandélate de méthyle.

Une forte diminution de la conversion enzymatique est observée, d'un facteur 4,8 si la lipase est irradiée fortement à 300 W, avec un taux de conversion observé de 7% en refroidissement constant contre 34 % sans refroidissement. Néanmoins, aucune différence significative sur le ratio énantiomérique n'est observée entre les deux méthodes, confirmant que l'irradiation micro-onde conduit à une modification de l'activité enzymatique sans pour autant modifier sa sélectivité.

La faible conversion du (*R*)-mandélate de méthyle (**5**) observée ne nous permet pas sa résolution efficace sous forte puissance d'irradiation. Pour optimiser la résolution, de faibles puissances d'irradiation semblent préférables (cf. : Chapitre 3).

Afin de confirmer ces observations, l'étude de l'influence de la variation de la puissance d'irradiation lors de la résolution du mandélate de méthyle par acétylation a été entreprise.

2. Etude de la puissance d'irradiation sur l'acétylation du mandélate de méthyle

L'acétylation du mandélate de méthyle en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée est une réaction très sélective¹³³. L'étude de l'influence de la puissance d'irradiation a été réalisée en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur diatomée, dans l'éther diisopropylique, à une température fixée de 35°C, en refroidissement constant (Cool Mate[®]) (Schéma 57 et Tableau 18).

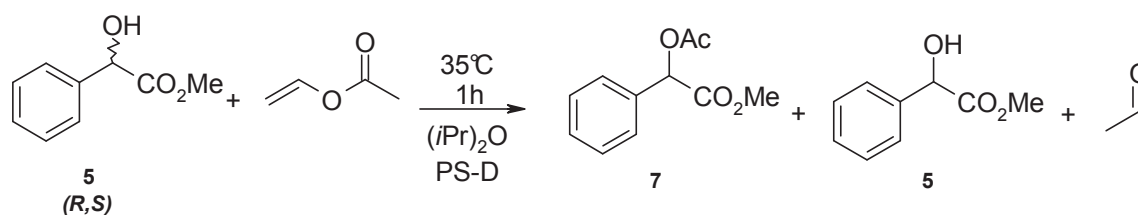


Schéma 57 : Acétylation du mandélate de méthyle sous irradiation micro-onde tout en refroidissant

¹³³ Queiroz N., Graça Nascimento M. *Pseudomonas sp.* lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (*R,S*)-methyl mandelate. *Tetrahedron Letters*. **2002**, 43, 5225-5227.

Chapitre II : Influence de l'irradiation sous champ micro-onde sur
la stabilité et l'activité des lipases

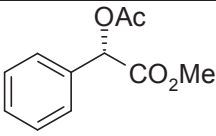
Température Micro-onde (°C)	Puissance (W)		c (%)
35	75		3
35	110		4
35	150		2
35	200		2
35	300		2

Tableau 18 : Etude de la puissance d'irradiation sur la résolution par acétylation du mandélate de méthyle

Quelle que soit la puissance d'irradiation appliquée, une faible quantité de diester ne dépassant pas les 4% est obtenue après une heure sous irradiation.

Cette réaction de biocatalyse a été menée avec ou sans refroidissement constant (Tableau 19).

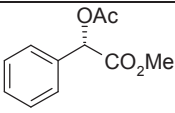
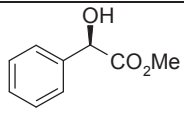
Mode irradiation	Température (°C)	Puissance (W)	c (%)	 (S)-diester ee (%)	 (R)-ester ee (%)
m.o. système ouvert sans refroidissement	35	15	15	98	12
m.o. système ouvert avec refroidissement	35	110	4	97	4

Tableau 19 : Comparaison entre deux puissances d'irradiation sur l'acétylation du mandélate de méthyle en utilisant la lipase de *Pseudomonas cepacia*

En refroidissement constant, à 110 W, une conversion extrêmement faible est observée comparée à l'irradiation micro-onde sans refroidissement. Cette chute de conversion pourrait être due à une déstabilisation des acides aminés polaires de l'enzyme, conduisant à son inactivation.

Comme dans le cas de l'amidification, la forte puissance d'irradiation semble désactiver totalement l'enzyme.

Dans de cas de l'amidification ou de l'acétylation du mandélate de méthyle, très peu de produits ne sont détectés, rendant l'analyse des résultats délicate. En effet, il n'est pas possible de distinguer véritablement l'effet de l'augmentation de la puissance d'irradiation sur le système étant donné que des résultats similaires faibles sont retrouvés pour toutes les puissances testées.

Conclusions

L'étude de stabilité de l'enzyme a été menée par chauffage classique ou sous irradiation micro-onde en système ouvert et en système fermé à différentes puissances d'irradiation à température constante.

La comparaison chauffage sous irradiation micro-onde-chauffage classique, montre que la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée conserve la même stabilité à 85°C quel que soit le système de chauffage. Les effets non-thermiques remarqués dans la plupart des publications traitant du sujet ne sont pas liés à la stabilité de l'enzyme seul mais à sa stabilité dans le micro-environnement réactionnel (solvant, substrat, température etc.). Les effets non thermiques observés lors de l'acétylation du géraniol par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée dépendent non seulement de la température du milieu, mais aussi du type de four micro-onde utilisé, délivrant une puissance d'irradiation différente, que l'on soit en système ouvert ou fermé.

Le facteur de la puissance d'irradiation semble donc être un facteur important influençant grandement l'activité de la lipase. Cet effet de l'augmentation de la puissance d'irradiation s'est révélé être dépendant de la réaction modèle étudiée :

-l'augmentation de la puissance d'irradiation se traduit par une baisse significative d'activité dans le cas de l'acétylation du géraniol

-l'augmentation de la puissance d'irradiation se traduit par une hausse importante de l'activité dans le cas de la résolution de l'hexan-2-ol.

Cependant lors de la résolution du mandélate de méthyle par les lipases de *Candida antarctica* ou de *Pseudomonas cepacia*, il nous a été difficile de trouver une corrélation évidente entre l'augmentation de la puissance d'irradiation et l'évolution des paramètres

*Chapitre II : Influence de l'irradiation sous champ micro-onde sur
la stabilité et l'activité des lipases*

intrinsèques de l'enzyme. Dans tous les cas, une forte puissance d'irradiation se traduit par une chute drastique de l'efficacité enzymatique.

Pour conduire à la résolution efficace d'alcools secondaires non linéaires, polyfonctionnalisés comme le mandélate de méthyle, nous avons entrepris une étude approfondie des paramètres réactionnels.

Partie Expérimentale

Méthodes générales

Pour les réactions nécessitant des conditions rigoureusement anhydres, les montages ont constamment été maintenus sous pression d'argon grâce à une rampe vide/argon. La verrerie a été préalablement flambée au bec Bunsen, refroidie au sein d'un dessiccateur avant d'être purgée à l'aide d'un gaz inerte (argon). Les solvants ont été dégazés, si nécessaire, par plusieurs cycles vide/argon avant leur utilisation, puis par un bullage d'argon dans le milieu réactionnel.

L'évolution des réactions et l'apparition des produits sont suivies par chromatographie sur couche mince analytique, sur des feuillets d'aluminium recouverts de gel de silice Merck 60 F254.

Les produits sont révélés :

- sous une lampe à ultraviolet à 254 nm (UV) pour les produits aromatiques.
- par une solution de vanilline à 1% et d'acide sulfurique à 5% dans l'éthanol.
- par une solution d'acide phosphomolybdique à 5% dans l'éthanol.
- par une solution aqueuse de permanganate de potassium à 5% et de carbonate de sodium à 1%.

La purification des produits se fait par chromatographie sur colonne de silice réalisée sur gel de silice Merck 60 (0.063-0.200 mm ; 70-230 mesh).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) et du carbone (RMN ^{13}C) ont été effectués :

- Sur un spectromètre de résonance magnétique nucléaire Jeol à des fréquences de travail de respectivement 399,65 et 100,4 MHz.

*Chapitre II : Influence de l'irradiation sous champ micro-onde sur
la stabilité et l'activité des lipases*

- Sur spectromètre de résonance magnétique nucléaire BRUKER Avance I 500 à des fréquences de travail de respectivement 500 et 125,8 MHz.

Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage des protons sont exprimées en Hertz (Hz).

Les spectres infrarouges sont mesurés sur un appareil Perkin-Elmer Spectrum 100 IRTF-ATR. Les nombres d'onde d'absorption (ν) sont donnés en cm^{-1} .

Les pouvoirs rotatoires spécifiques des composés présentant un ou plusieurs carbones asymétriques ont été déterminés avec un polarimètre Perkin Elmer. La rotation de la lumière polarisée par les produits dissous dans du chloroforme a été mesurée dans une cuve de 10 cm de long à une température constante de 20°C. La raie D (589,9 nm) d'une lampe à sodium a été utilisée comme source de lumière incidente. Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ est alors calculé comme suit :

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = [\alpha]_{\text{D exp.}}^{20} / (L \times C) \quad \text{avec } [\alpha]_{\text{D exp.}} : \text{valeur moyenne mesurée sur 5 lectures (deg.)}$$

L : longueur de la cuve (dm)

C : concentration massique de la solution ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

Dans la description des constantes physiques des composés, la concentration c est exprimée en g/100 mL.

Les points de fusion, exprimés en degrés Celsius (°C) sont mesurés sur un banc Kofler et ne sont pas corrigés.

Les spectres de masse ont été réalisés à Rennes au Centre Régional de Mesure Physique de l'Ouest sur un spectromètre Varian Mat 311.

Analyse par Chromatographie en phase gazeuse

Les chromatographies en phase gazeuse sont réalisées sur un système Agilent 7890A équipé d'une colonne chirale CP-Chirasil-Dex (Cromopack). L'injection est faite à l'aide d'une seringue de 10 μ L pouvant injecter entre 0.2 et 2 μ L. Les injections sont réalisées par un passeur (7688B). Le détecteur est de type ionisation de flamme.

Les débits de gaz sont les suivants :

Débit colonne (N₂) : 1.5mL/min

Débits détecteurs (FID) :

-Air : 350mL/min

-H₂ : 35mL/min

-N₂ : 14mL/min

T°C injecteur : 180°C

T°C détecteur : 180°C

Pour tous les chromatogrammes, l'axe des x représente le temps (en minutes) et l'axe des y l'intensité (en pA)

Fours micro-ondes utilisés.

Deux types de fours micro-ondes ont été utilisés pour les réactions de biocatalyse :

En système ouvert :

Un four CEM Discover® qui possède les caractéristiques suivantes a été utilisé:



- Four monomode de troisième génération

*Chapitre II : Influence de l'irradiation sous champ micro-onde sur
la stabilité et l'activité des lipases*

- Température : t.a. - 300°C, avec un contrôle de température par capteur infra-rouge (lecture verticale).
- Montée en température : 2-6°C/s
- Volume opérationnel : 0,2-75mL
- Type d'agitation : Agitation magnétique (controlable)
- Puissance : 0-300 W (incrémentations de 1 W)
- Suivi de la réaction sur ordinateur

Un refroidisseur de type Cool Mate[®] a été utilisé en complément du four Discover pour maintenir les réactions à une température proche de l'ambiante tout en irradiant à plus ou moins forte puissance. Les caractéristiques techniques du Cool mate[®] sont les suivantes :



- Température : -80°C-40°C avec un contrôle de température par fibre optique
- Volume opérationnel : 0,25-7mL
- Puissance : 0-300 W
- Refroidissement avec un liquide cryogénique perfluoré (Galden) transparent à l'irradiation

En système fermé :

En système fermé, nous avons utilisé un four micro-onde de type Biotage Initiator Eight qui présente les caractéristiques suivantes :

*Chapitre II : Influence de l'irradiation sous champ micro-onde sur
la stabilité et l'activité des lipases*



- Température : 40°C-250°C, avec un contrôle de température par sonde infrarouge.
- Montée en température : 2-5°C/s
- Type d'agitation : Agitation magnétique (controlable)
- Volume opérationnel : 2-5mL
- Puissance : 0-400 W
- Pression : 0-20 bars
- Refroidissement par air
- Robot Eight permettant la programmation de 8 réactions consécutives

Données spectroscopiques et chromatographiques

Etude de la stabilité enzymatique sous irradiation micro-onde

Dans un tube, 1 gramme de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (Novozyme 435) est irradié sous champ micro-onde en système ouvert à 85°C pendant une ou deux heures. L'activité résiduelle de la lipase est ensuite déterminée.

A une solution de 48mL de tampon phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7,0 sont ajoutés 1,47 mL (5,02 mmol) de tributyrine. Après l'ajout de 20mg de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique issue de l'irradiation à 85°C, l'activité lipolytique de l'enzyme est dosée à l'aide d'un pH-stat, à pH 7,0 par titration de l'acide butyrique libéré avec une solution de NaOH 100mM.

Etude de l'acétylation du géraniol par utilisation de lipase en chauffage conventionnel (METHODE A)

Sous atmosphère inerte, à un mélange de 308 mg (2 mmol) de géraniol (**1**) et 3 mmol d'acétate de vinyle fraîchement distillés (0,24 mL) est ajoutée la lipase B de *Candida antarctica* (8mg). Le mélange est chauffé au bain marie ou au bain d'huile aux températures indiquées (50, 75 ou 100°C). Après consommation totale du géraniol suivie par CCM, la lipase est éliminée par filtration. Le solvant est évaporé sous vide. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (EP/EtOAc : 80/20). L'acétate de géranyle (**2**) et le géraniol restant (**1**) sont obtenus à l'état pur.

Etude de l'acétylation du géraniol par utilisation de lipase en chauffage sous irradiation micro-onde en système ouvert (METHODE B)

Sous atmosphère inerte, à un mélange de 308 mg (2 mmol) de géraniol et 3 mmol d'acétate de vinyle fraîchement distillés (0,24 mL) est ajoutée la lipase B de *Candida antarctica* (8mg). Le mélange est chauffé sous irradiation micro-onde en système ouvert (CEM Discover) aux températures indiquées (50, 75 ou 100°C). Après consommation totale

du géraniol suivie par CCM, la lipase est filtrée, le solvant est évaporé et une chromatographie sur colonne de silice (EP/EtOAc 80/20) permet d'obtenir à l'état pur l'acétate de géranyle (2) et le géraniol restant (1).

Etude de l'acétylation du géraniol par utilisation de lipase en chauffage sous irradiation micro-onde en système fermé (METHODE C)

Sous atmosphère inerte d'argon, à un mélange de 308 mg (2 mmol) de géraniol et 3 mmol d'acétate de vinyle fraîchement distillées (0,24 mL) est ajoutée la lipase B de *Candida antarctica* (8mg). Le mélange est chauffé sous irradiation micro-onde en système fermé (Biotage Initiator eight) aux températures indiquées (50, 75 ou 100°C). Après consommation totale du géraniol suivie par CCM, la lipase est filtrée, le solvant est évaporé et une chromatographie sur colonne de silice (EP/EtOAc 80/20) permet d'obtenir à l'état pur l'acétate de géranyle (2) et le géraniol restant (1).

Mesure de la dégradation enzymatique sous forte température (METHODE D)

Sous atmosphère inerte, à un mélange de 308 mg (2 mmol) de géraniol et l'acétate de vinyle fraîchement distillé (3 mmol, 0.24 mL) est ajoutée la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (8 mg). Le brut réactionnel est chauffé sous irradiation micro-onde en système fermé à 150 °C entre 0 et 120 minutes. Après refroidissement à l'air, la lipase est filtrée, lavée avec 5 mL de trifluorotoluène puis séchée soigneusement et conservée sous atmosphère inerte d'argon. La lipase est ensuite ajoutée à une solution de géraniol (308 mg, 2 mmol) et d'acétate de vinyle (3 mmol, 0.24 mL). Le brut réactionnel est chauffé sous irradiation micro-onde en système ouvert, à 75°C pendant 45 minutes. La lipase est ensuite filtrée, le brut réactionnel est évaporé sous pression réduite et une chromatographie sur colonne permet de séparer l'acétate de géranyle (2) du géraniol (1) restant.

Etude de l'irradiation micro-onde sur l'estérification du géraniol (METHODE E)

Dans un réacteur en quartz en système ouvert, sont successivement ajoutés le géraniol commercial (3 mmol, 308 mg) en solution dans 1 mL de trifluorotoluène, 2 mmol (0.19 mL) d'acétate de vinyle. Le mélange est mis sous irradiation micro-onde à basse température. Dès que la température du liquide cryogénique est stable (les irradiations sont suivies pour des températures du liquide cryogénique comprises entre -20 et 20°C), la lipase de *Candida antarctica* immobilisée (8mg) est ajoutée et le brut réactionnel est laissé sous irradiation micro-ondes à 35°C pendant 45 minutes. La lipase est ensuite filtrée, le brut évaporé sous pression réduite et une chromatographie sur colonne (EP/EtOAc : 80/20) permet de séparer l'acétate de géranyle (2) du géraniol restant (1).

(E)-3,7-Diméthyl-octa-2,6-diène-1-ol ou géraniol (1)

	$C_{10}H_{18}O$ MM = 154.25 g.mol ⁻¹ Huile incolore
---	--

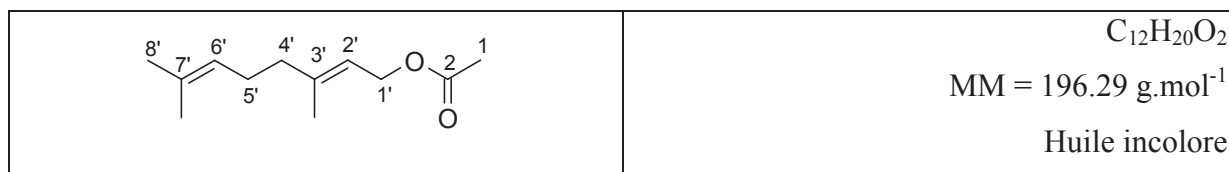
Le produit est obtenu suivant la méthode **A**, **B**, **C**, **D** ou **E**.

ν (cm⁻¹) : 3330, 2957, 2921, 1558, 1370, 1055.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 5,41 (t, 1H, *J*=6,0 Hz, **H2**) 5,09 (t, 1H, *J*=6,0 Hz, **H6**) 4,16 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, **H1**); 4,13 (s, 1H, **OH**); 1,99-2,15 (m, 4H, **H4** et **H5**); 1,65-1,70 (m, 6H, 2x**CH3**); 1,60 (s, 3H, **CH3**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 139,3 (**C3**) ; 134,1 (**C7**) ; 126,1 (**C2**) ; 115,8 (**C6**) ; 59,2 (**C1**) ; 39,6 (**C4**) ; 26,3 (**C5**) ; 25,8 (**CH3**) ; 17,8 (**CH3**); 16,2 (**CH3**).

Acétate de (E)-3,7-diméthyl-octa-2,6-diène ou acétate de géranyle (2)



Le produit est obtenu suivant la méthode **A, B, C, D** ou **E**.

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)
A	50-100	100
B	50-100	100
C	50-100	99
D	150	24
E	35	97

ν (cm⁻¹) : 3457, 2968, 2923, 1736, 1671, 1442, 1366, 1229, 1022, 953.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 5,35 (t, 1H, *J*=2,0 Hz, **H2'**), 5,08 (t, 1H, *J*=4,6 Hz, **H6'**); 4,59 (d, 2H, *J*=8,0 Hz, **H1'**); 2,11 (s, 3H, **H1**); 2,05 (s, 4H, **H1'**et **H5'**); 1,71 (s, 3H, **H8'**); 1,69 (s, 3H, **CH3**); 1.60 (s, 3H, **CH3**).

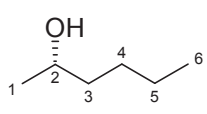
¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 170,6 (**C2**) ; 141,8 (**C3'**) ; 131,4 (**C7'**) ; 123,6 (**C2'** ou **C6'**) ; 118,1 (**C2'** ou **C6'**) ; 61,1 (**C1'**) ; 39,4 (**C4'**) ; 26,1 (**C5'**) ; 25,5 (**CH3**) ; 20,1 (**CH3**) ; 17,4 (**CH3**) ; 16,3 (**CH3**).

SMHR calculée pour C₁₀H₁₆CH₃COOH :136.12520, trouvée : 136.1258

**Etude de l'irradiation micro-onde sur la résolution de l'hexan-2-ol (METHODE
F)**

Un réacteur en quartz en système ouvert contenant l'hexan-2-ol (1 mmol, 0.125 mL) en solution dans 1 mL de trifluorotoluène et 10 mmol (1.09 mL) de propionate de vinyle est irradié par micro-onde en maintenant une basse température. Dès que la température du liquide cryogénique se stabilise (entre -20°C et 20°C), la lipase de *Candida antarctica* immobilisée (20mg) est ajoutée. Le mélange réactionnel est irradié à 35°C pendant 60 minutes. La lipase est ensuite filtrée, 0,2 mL du filtrat sont prélevés pour analyse CPG et une chromatographie sur colonne (EP/EtOAc : 80/20) permet de séparer les produits de réaction.

(S)-Hexan-2-ol (3)

	$C_6H_{14}O$ MM = 102,10 g.mol ⁻¹ Huile incolore
--	---

Obtenu par la méthode **F** avec 86 % de rendement.

$[\alpha]_D$: +12,2° (c = 1,0 EtOH)

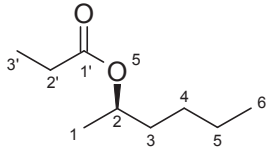
Conditions CPG: Température de la colonne durant l'analyse pendant 80 min : 90°C

ν (cm⁻¹) : 3348, 2963, 2932, 2862, 1458, 1373, 1327, 1146, 1111, 1053, 1018, 941, 841

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 3,74-3,80 (m, 1H, **H2**); 1,16-1,45 (m, 6H, **H3**, **H4** et **H5**); 1,18 (d, 3H, $J=7,6$ Hz, **H1**); 0,91 (t, 3H, $J=7,6$ Hz, **H6**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 67,7 (**C2**); 39,2 (**C3**); 27,8 (**C4**); 23,1 (**C5**); 22,5 (**C1**); 13,9 (**C6**).

(R)-Propionate de sec hexyle (4)

	$C_9H_{18}O_2$ MM = 158,24 g.mol ⁻¹ Huile incolore
---	---

Obtenu par la méthode F avec 39 % de rendement.

$[\alpha]_D$: -35,1° (c = 1,0 EtOH)

Conditions CPG: Température de la colonne durant l'analyse pendant 80 min : 90°C

ν (cm⁻¹) 2950, 2935, 1720, 1110.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 4,84-4,88 (m, 1H, , **H2**); 2,25 (q, 2H, *J*=8,0 Hz, **H2'**); 1,2-1,5 (m, 6H, **H3**, **H4** et **H5**); 1,16 (d, 3H, *J*=8,0 Hz, **H1**); 1,09 (t, 3H, *J*=8,0 Hz, **H3'**); 0,85 (t, 3H, *J*=6.9 Hz, **H6**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 170,7 (**C1'**) ; 35,6 (**C2**) ; 27,0 (**C2'** ou **C3**); 27,5 (**C2'** ou **C3**) ; 22,4 (**C4**) ; 19,9 (**C5**); 13,9 (**C4'**) ; 5,1 (**C6**).

Etude de l'influence de la puissance d'irradiation : (METHODE G)

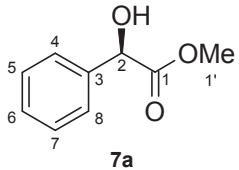
- **Etude de l'irradiation micro-onde sur l'amidification du mandélate de méthyle**

Dans un réacteur en quartz, le mandélate de méthyle (1.2 mmol, 0.2 g) est mis en solution dans 1 mL de trifluorotoluène contenant 2.4 mmol (0.19 mL) d'allylamine commerciale. Le mélange est mis sous irradiation micro-onde en système ouvert à basse température. Dès que la température voulue est atteinte au sein du réacteur (20°C ou 35 °C); et que la température du liquide cryogénique est stable, la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (200mg) est ajoutée et le brut réactionnel est mis sous irradiation micro-ondes pendant les temps indiqués (10 ou 60 minutes). La lipase est ensuite filtrée, 0,2 mL de filtrat est prélevé pour analyse CPG et une chromatographie sur colonne (DCM 100%) permet de séparer

- **Etude de l'irradiation micro-onde sur l'estérification du mandélate de méthyle**

Dans un réacteur en quartz, le mandélate de méthyle (0.6 mmol, 100 mg) est mis en solution 1 mL d'ether diisopropylique contenant 6 mmol (0.6 mL) d'acétate de vinyle. Le mélange est mis sous irradiation micro-onde en système ouvert à basse température. Dès que la température voulue est atteinte (35°C); et que la température du liquide cryogénique est stable, la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur diatomée (100mg) est ajoutée et le brut réactionnel est mis sous irradiation micro-onde pendant une heure. La lipase est ensuite filtrée, 0,2 mL de filtrat est prélevé pour analyse CPG et une chromatographie sur colonne (DCM 100%) permet de séparer les produits de réaction

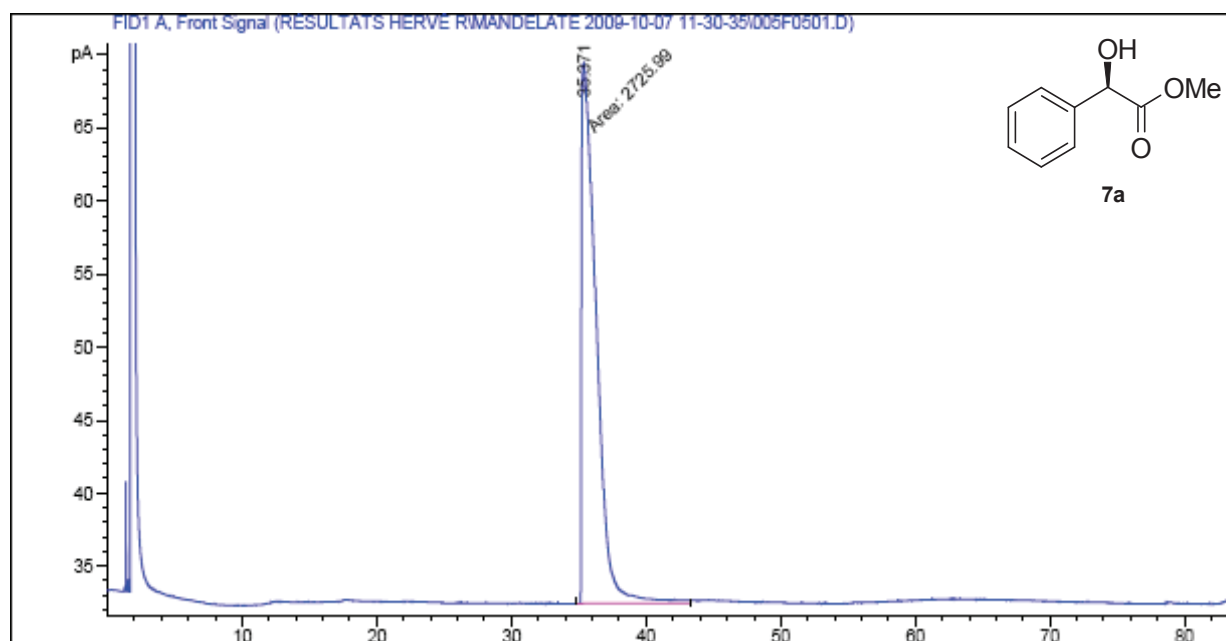
(R)-Mandélate de méthyle (5a)

 <p>7a</p>	<p>$C_9H_{10}O_3$ MM = 166,17 g.mol⁻¹ Poudre blanche Pf. : 56°C</p>
---	---

Obtenu par **G** avec un rendement de 40% et un ee de 12%.

Conditions CPG : Montée de 80°C à 110° à 2°C/min (20 minutes) puis montée de 110°C à 180°C à 2°C/min. tr: 35.3 min

[α]_D : -142° (c = 1,0 CHCl₃)



Chromatogramme du (*R*)-mandélate de méthyle

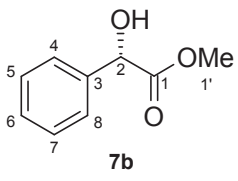
ν (cm^{-1}) : 3437, 2955, 1739, 1208, 737.

^1H RMN (400MHz, CDCl_3 , ppm): 7,32-7,45 (m, 5H, H_{arom}); 5,18 (s, 1H, H_2); 3,77 (s, 3H, H_1''); 3,45(s, 1H, OH)

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3 , ppm) : 174,1 (C1) ; 138,2 (C3); 128,6 (C_{arom}); 128,5 (C_{arom}) ; 126,6 (C_{arom}); 72,9(C2); 53,0 (C1'').

SMHR calculée pour $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3\text{Na}$: 189.05276, trouvé : 189.0525.

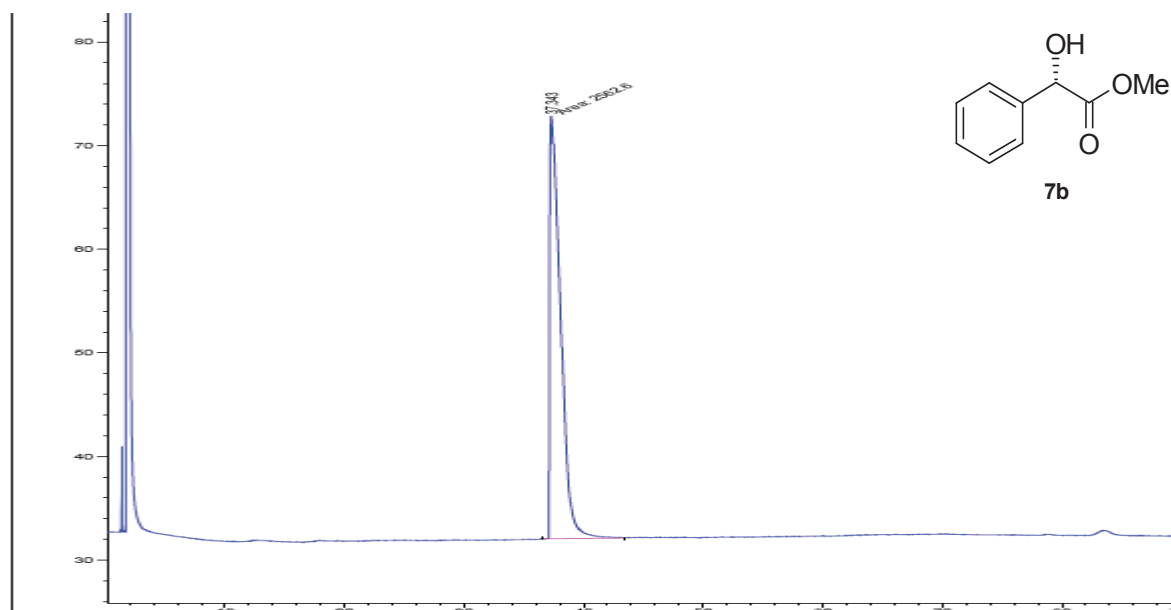
(S)-Mandélate de méthyle (5b)

	$C_9H_{10}O_3$ MM = 166,17 g.mol ⁻¹ Poudre blanche Pf. : 56°C
---	---

Obtenu par la méthode P avec un rendement de 96% et un ee de 4%.

Conditions CPG : Montée de 80°C à 110° à 2°C/min (20 minutes) puis montée de 110°C à 180°C à 2°C/min.tr : 37.3 min

[α]_D : +142° (c = 1,0 CHCl₃)



Chromatogramme du (S)-mandélate de méthyle

ν (cm⁻¹) : 3437, 2955, 1739, 1208, 737.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm): 7,32-7,45 (m, 5H, H_{arom}); 5,18 (s, 1H, H₂); 3,77 (s, 3H, H_{1''}); 3,45(s, 1H, OH).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 174,1 (C₁) ; 138,2 (C₃); 128,6 (C_{arom}); 128,5 (C_{arom}) ; 126,6 (C_{arom}); 72,9(C₂); 53,0 (C_{1''}).

(R)-N-Allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (6a)

 <p style="text-align: center;">8a</p>	<p style="text-align: center;">$C_{11}H_{13}NO_2$ MM = 191,23 g.mol⁻¹ Huile incolore</p>
--	--

Le produit est obtenu par la méthode **G** avec un rendement de 7 % et un ee de 9% .

Conditions CPG : 90 minutes à 140°C. tr : 68,4 min

[α]_D : -69,7° (c = 1,0, MeOH)

ν (cm⁻¹) : 3304, 2921, 1654, 1641, 1525, 1061.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 7,08-7,21 (m, 5H, **Harom**); 6,66 (s, 1H, **NH**); 5,65-5,81 (m, 1H, **H2'**); 5,00-5,10 (m, 2H, **H3'**); 4,93 (s, 1H, **H2**); 3,95 (s, 1H, **OH**); 3,74-3,81 (m, 2H, **H1'**),

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 172,1 (**C1**) ; 139,2 (**C3**) ; 133,1 (**Carom**) ; 128,0 (**Carom**) ; 127,7 (**Carom**) ; 126,2 (**C3'**) ; 115,8 (**C2'**) ; 73,7 (**C2**) ; 41,0 (**C1'**).

SMHR calculée pour C₁₁H₁₃NO₂Na : 214.0844, trouvée : 214.0841

**Chapitre III : Etude comparative de résolutions
énantiosélectives d'alcools secondaires sous
irradiation micro-onde en présence de lipases**

Bon nombre de molécules à activités biologiques possèdent une ou plusieurs fonctions alcools secondaires chirales déterminantes dans leur activité biologique. La synthèse par résolution enzymatique de ces centres chiraux représente une méthode alternative efficace comparée aux catalyseurs chimiques pour la synthèse de ces composés d'intérêt ¹³⁴.

Il est admis que la qualité de la catalyse enzymatique est étroitement corrélée au type de réaction étudiée et surtout aux conditions opératoires appliquées.

Dans la recherche de nouvelles voies de synthèse de molécules à activités biologiques, nous nous sommes intéressés à la biocatalyse assistée sous irradiation micro-onde.

Nous avons, dans un premier temps procédé aux essais d'optimisation de résolutions enzymatiques que ce soit par utilisation du réacteur solide/gaz, étudié au sein du laboratoire, ou par irradiation sous champ micro-onde, sur des modèles « simples » d'alcools secondaires linéaires. Dans un second temps, nous sommes revenus à l'optimisation de la résolution sous irradiation micro-onde du mandélate de méthyle.

PARTIE I. Etude de résolutions d'alcools secondaires linéaires catalysées par la lipase B de *Candida antarctica*

Nous avons tout d'abord entrepris la résolution par la lipase B de *Candida antarctica* d'alcools secondaires linéaires puis comparé les résultats obtenus par les deux types de chauffages non-conventionnels : sous irradiation micro-onde et en réacteur solide /gaz, le but de l'étude étant de pouvoir discriminer rapidement les paramètres influençant la catalyse sous irradiation micro-onde.

Les alcools secondaires linéaires présentent l'avantage d'être idéaux pour l'étude de réactions modèles car ils sont mono-fonctionnels, de faible poids moléculaire et sont simples à analyser et purifier. L'utilisation de la lipase B de *Candida antarctica* est de nouveau motivée par la grande sélectivité de cet enzyme pour la résolution de mélanges racémiques ^{135,136}.

¹³⁴ Jurček O., Wimmerová M., Wimmer Z. Selected chiral alcohols: Enzymic resolution and reduction of convenient substrates. *Coordination Chemistry Reviews*. **2008**, 252, 767-781.

¹³⁵ Zhou H., Chen J., Ye L., Lin H., Yuan Y. Enhanced performance of lipase-catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols in monoether-functionalized ionic liquids. *Bioresource Technology*. **2011**, 102, 5562-5566.

¹³⁶ Bencze L.C., Paizs C., Toşa M.I., Trif M., Irimie F.D. CaL-B a highly selective biocatalyst for the kinetic resolution of furylbenzthiazole-2-yl-ethanols and acetates. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, 21, 1999-2004.

La première partie de cette étude a porté sur la résolution d'alcools secondaires linéaires ayant une longueur de chaîne carbonée de 4 à 6 carbones, en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* (Schéma 58). L'étude de paramètres réactionnels tels que la température, le choix d'un solvant ou le mode de chauffage pourra nous permettre de choisir rapidement les paramètres qui influencent le plus l'activité et la sélectivité de la lipase sous irradiation micro-onde.

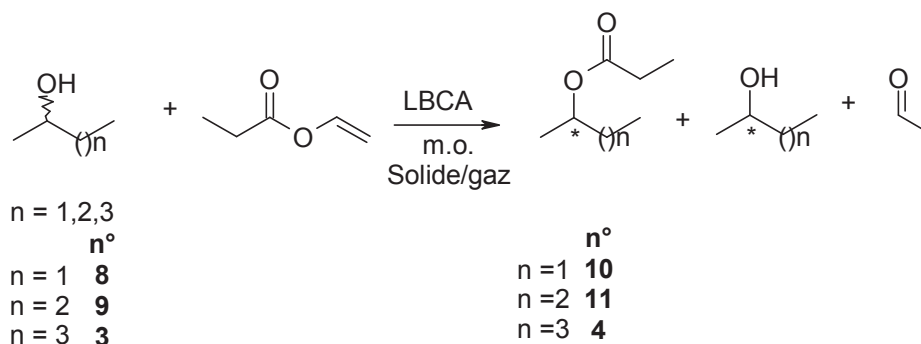


Schéma 58 : Résolution d'alcools secondaires linéaires par la lipase B de *Candida antarctica* en présence du propionate de vinyle en tant que donneur d'acyle

I. Choix des paramètres réactionnels

Les alcools choisis ne sont ni ramifiés, ni insaturés, ni polyfonctionnalisés afin d'éviter au maximum des interactions parasites de nature stériques ou électrostatiques avec l'enzyme. Peu onéreux, ces alcools peuvent être aisément extraits et purifiés, et sont connus pour être substrats de la lipase B de *Candida antarctica*¹³⁷.

D'après les travaux précédemment effectués par l'équipe du Professeur Graber, il a été montré que la lipase B de *Candida antarctica* est un enzyme utilisable en réacteur solide/gaz, dans la résolution d'alcools secondaires⁸².

¹³⁷ Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J. *Hydrolases in Organic synthesis* 2nd Ed. 2006. WILEY-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 99-124.

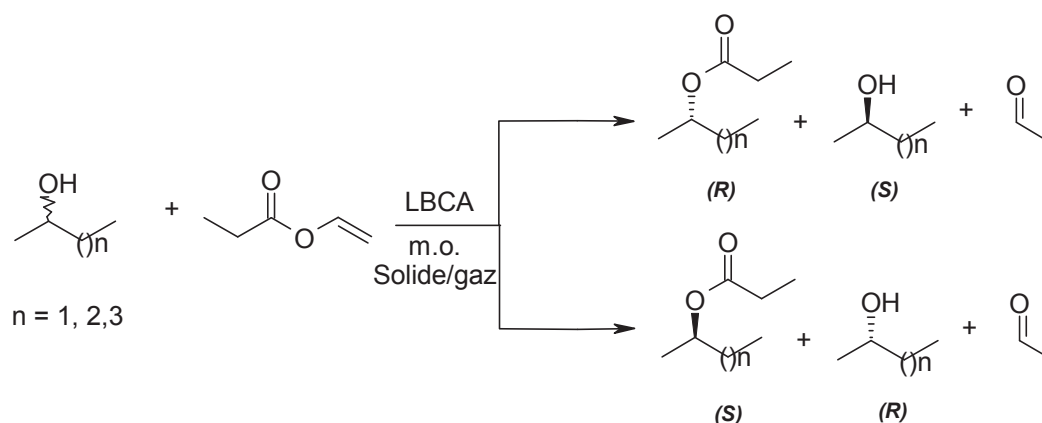


Schéma 59 : Résolution d'alcools secondaires linéaires par utilisation de la lipase B de *Candida antarctica*

La comparaison des modes de chauffage vise à (Schéma 59) :

- Déterminer l'énantiopréférence de la lipase B de *Candida antarctica* soumise à ces deux modes de chauffage en milieu non-conventionnel
- Comprendre les contraintes stériques de la lipase en faisant varier la longueur de la chaîne carbonée du substrat.
- Tenter une première optimisation, sous irradiation micro-onde, des paramètres influençant la sélectivité de l'enzyme.

La réaction a tout d'abord été réalisée à 45°C, dans un minimum de solvant (1mL de trifluorotoluène) pour permettre une solubilité totale des substrats. Un temps de réaction très court de 10 minutes a été appliqué pour permettre le calcul aisé de la sélectivité de la lipase, en prenant pour hypothèse que la réaction soit en vitesse initiale. Le ratio énantiomérique est déterminé comme le rapport des aires retrouvées en CPG en s'affranchissant du calcul des paramètres enzymatiques intrinsèques.

L'énantiomère majoritaire après réaction est déterminé par une comparaison avec des étalons énantiopurs commerciaux.

II. Résolution d'alcools secondaires linéaires sous irradiation micro-onde et chauffage en réacteur solide/gaz

Les résolutions d'alcools secondaires linéaires ont été étudiées en chauffage sous irradiation micro-onde en système ouvert (10W) et en réacteur solide/ (Schéma 60).

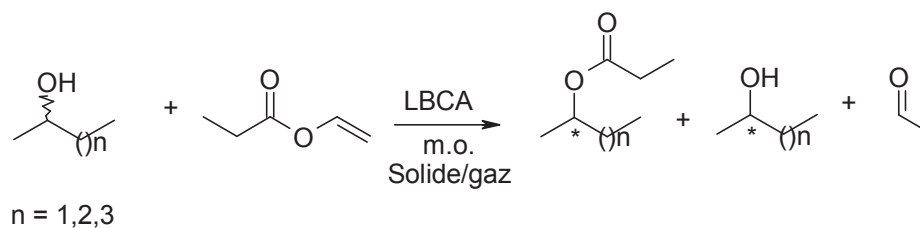


Schéma 60 : Résolution d'alcools secondaires linéaires sous irradiation micro-onde ou en réacteur solide/gaz.

L'efficacité des résolutions des alcools secondaires par la lipase B de *Candida antarctica* a tout d'abord été comparée à 45°C, par chauffage sous irradiation micro-onde et en réacteur solide/gaz (Schéma 61).

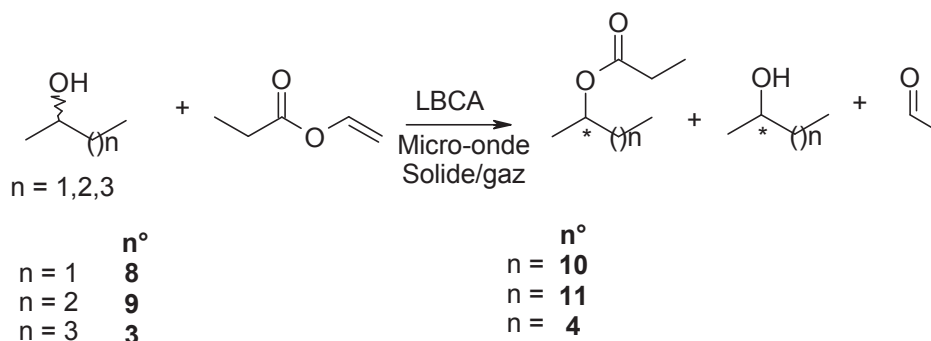


Schéma 61 : Résolution d'alcools secondaires linéaires sous irradiation micro-onde ou en réacteur solide/gaz à 45°C.

Après 10 minutes et analyse des résultats, les ratios énantiométriques calculés ont été reportés dans le tableau 20.

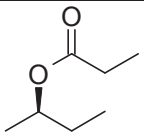
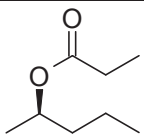
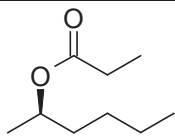
Mode de chauffage	 10 E	 11 E	 4 E
Micro-onde	4,2	105	305
Solide/gaz	4,6	100	297

Tableau 20 : Etude comparative des ratios énantiomériques calculés lors de la résolution d'alcools secondaires sous irradiation micro-onde et par chauffage en réacteur solide/gaz

1. Comparaison de la résolution entre chauffage sous irradiation micro-onde et en réacteur solide/gaz

Que ce soit par utilisation de la technologie solide/gaz ou micro-onde, les propanoates de sec-butyle (**10**), de sec-pentyle (**11**) ou de sec-hexyle (**4**) sont retrouvés majoritairement sous la configuration (*R*). Ce résultat est en adéquation avec la règle de Kazlauskas.

En comparant les deux technologies utilisées, on remarque que les ratios énantiomériques sont très comparables et ce, avec tous les substrats étudiés. On observe par exemple de modestes ratios énantiomériques de 4,2 lors de la résolution du butan-2-ol sous irradiation micro-onde, et de 4,6 en utilisant le réacteur solide/gaz.

2. Comparaison de la résolution par augmentation de la taille de la chaîne carbonée

Pour des substrats de taille plus importante comme le butan-2-ol, on constate une augmentation spectaculaire des ratios énantiomériques, que ce soit par l'irradiation micro-onde ou le chauffage en réacteur solide/gaz.

Le ratio énantiomérique le plus important est observé en présence de l'hexan-2-ol ($E > 297$). L'augmentation de la chaîne carbonée augmente la gêne stérique du substrat à l'intérieur du site actif de l'enzyme et permet une meilleure discrimination entre les deux énantiomères.

Dans le cas de ces résolutions d'alcools secondaires, une grande similitude entre les ratios énantiomériques est observée entre le chauffage sous irradiation micro-onde et en réacteur solide/gaz. Ces deux modes de chauffage sont donc utilisables pour la résolution d'alcools secondaires.

Le chauffage sous irradiation micro-onde possède cependant des avantages comparés au réacteur solide gaz :

- Utilisation de solvant à faible pression de vapeur comme les liquides ioniques.
- Utilisation de températures extrêmes.
- Utilisation de substrats non-volatile ou solides.

Pour des raisons de facilité, nous avons utilisé par la suite uniquement le chauffage sous irradiation micro-onde pour l'étude des autres réactions.

Nous avons, dans un premier temps, tenté d'optimiser la résolution de ces alcools secondaires linéaires en faisant varier deux paramètres importants que sont la gamme de température et le choix du solvant.

III. Optimisation des résolutions enzymatiques sous irradiation micro-onde

1. Résolution des alcools secondaires linéaires entre 35°C et 95°C

Afin de savoir si la lipase B de *Candida antarctica* est, dans un milieu aprotique polaire comme le trifluorotoluène, capable de réaliser une catalyse enzymatique efficace dans une large gamme de température, nous avons envisagé la résolution du butan-2-ol, du pentan-2-ol ou de l'hexan-2-ol en modulant la température entre 35°C et 95°C (Schéma 62).

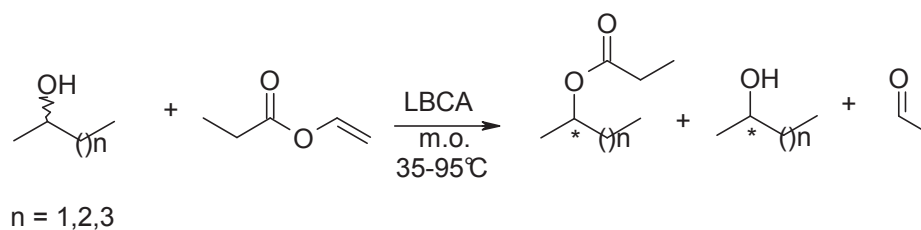


Schéma 62 : Résolution des alcools secondaires linéaires entre 35°C et 95°C.

Après analyses de la résolution dans la gamme de température, les ratios énantiomériques et les taux de conversion ont été calculés (Tableau 21).

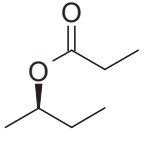
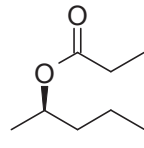
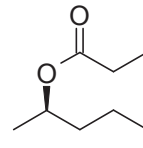
Température (°C)	 10		 11		 4	
	c (%)	E	c (%)	E	c (%)	E
35	7	4,3	5	104	4	307
45	7	4,2	6	105	4,5	308
55	7	4,1	6	105	5	309
65	8	3,8	7	106	5	308
75	9	3,7	7	106	5	308
85	9	3,6	7	106	5,3	307
95	9	3,6	8	107	5,5	305

Tableau 21 : Taux de conversion et ratio énantiomériques observés lors de la résolution des alcools secondaires linéaires par la LBCA entre 35°C et 95°C.

1. Comparaison des taux de conversion entre 35°C et 95°C

Pour toutes les résolutions étudiées, une légère augmentation de la conversion enzymatique est observée par élévation de la température. Cette conversion enzymatique pourrait être due à l'augmentation favorable du nombre de collisions entre les groupements polaires du substrat et de ceux de la lipase.

Pour tous les alcools testés, la hausse des taux de conversion de l'ordre de 1 à 2 % sous irradiation micro-onde est très encourageante pour deux raisons :

- Ces résultats nous montrent que la lipase B de *Candida antarctica* est très stable jusqu'à des températures qui sont normalement fortement dénaturantes. Ce résultat confirme en partie ceux retrouvés dans le chapitre 2 lors de l'acétylation du géraniol.

- En chauffant l'enzyme à forte température, nous sommes en droit d'espérer une bonne conversion enzymatique lors de la résolution d'alcools secondaires plus complexes.

2. Comparaison des ratios énantiomériques entre 35°C et 95°C

Pour toutes les températures étudiées et pour tous les alcools secondaires testés, la lipase B de *Candida antarctica* conserve une bonne sélectivité y compris pour des températures plus élevées. L'énantiopréférence de la lipase ne semble pas être non plus modifiée quelle que soit la température appliquée.

Les meilleurs ratios énantiomériques sont observés pour les alcools secondaires comportant la chaîne carbonée plus longue, avec une excellente sélectivité pour le pentan-2-ol et l'hexan-2-ol pour toutes les températures étudiées.

2. Utilisation de liquides ioniques

Les liquides ioniques, sont des sels souvent utilisés avec succès lors de résolutions enzymatiques¹³⁸. Leur nature très polaire les rend idéaux pour une montée rapide de température sous irradiation micro-onde. Ils possèdent également une grande viscosité pouvant stabiliser l'enzyme. Cette viscosité entraîne cependant des problèmes de transfert de masse.

Afin de mieux appréhender le comportement de la lipase B de *Candida antarctica* en présence de liquides ioniques, nous avons envisagé l'utilisation de liquides ioniques de seconde génération : le [BMIM][BF₄] et [BMIM][PF₆] (Figure 8), largement utilisés en synthèse enzymatique¹³⁹.

¹³⁸ Van Rantwijk F., Madeira R., Lau, Sheldon R. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *TRENDS in Biotechnology*. **2003**, 21, 131-138.

¹³⁹ Van Rantwijk F., Sheldon R. Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical Review*. **2007**, 107, 2757-2785.

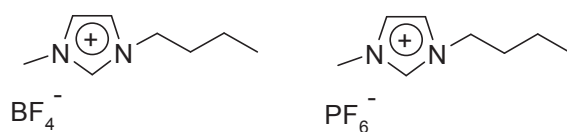


Figure 8 : Structure du tétrafluoroborate de 1-butyl-3-méthyl-imidazolium et de l'hexafluorophosphate de 1-butyl-3-méthyl-imidazolium

La résolution du butan-2-ol par la lipase B de *Candida antarctica*, a été menée sous irradiation micro-onde à 45°C, pendant 10 minutes dans ces liquides ioniques (1mL) en lieu et place du trifluorotoluène (Schéma 63).

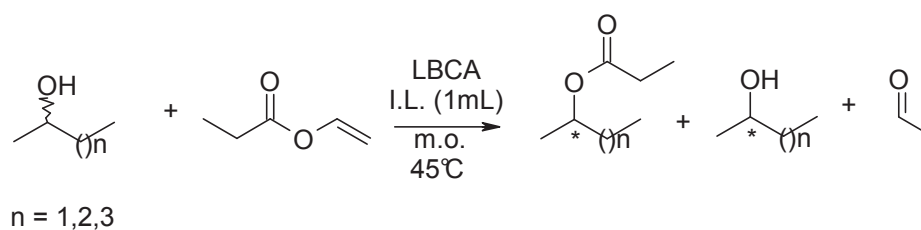


Schéma 63 : Résolution d'alcools secondaires linéaires dans des liquides ioniques

Les excès énantiomériques et les taux de conversion déterminés par CPG après réaction sont donnés dans le tableau suivant (Tableau 22) :

Molécule Solvant ajouté	10		11		4	
	c (%)	E	c (%)	E	c (%)	E
Sans (TFT)	7	4,4	6	105	4,5	307
[BMIM][BF ₄]	4	4,2	6	102	2	295
[BMIM][PF ₆]	8	5,4	7	104	2,1	290

Tableau 22 : Résolution des alcools secondaires linéaires catalysée par la LBCA par utilisation de liquides ioniques à 45 °C

Les résultats ne montrent pas de différence significative entre l'utilisation du liquide ou non. Aucune hausse ou baisse spectaculaire de conversion ou des ratios énantiomériques n'est observée. Le plus grand contraste observé est celui obtenu lors de la résolution de l'hexan-2-ol, où une conversion deux fois plus faible est notée en présence de liquide ionique ($c(\%) = 2,1$) comparée à l'utilisation d'un solvant organique classique ($c(\%) = 4,5$).

Les liquides ioniques ne semblent donc pas affecter la catalyse enzymatique sous irradiation micro-onde lors de la résolution de ces divers alcools secondaires linéaires.

3. Conclusions sur la résolution d'alcools secondaires linéaires

La comparaison de la résolution enzymatique d'alcools secondaires linéaires non ramifiés (du butan-2-ol, du pentan-2-ol et de l'hexan-2-ol) (Schéma 64) en présence de la lipase B de *Candida antarctica* sous champs micro-onde ou par utilisation de réacteurs solide/gaz ont permis de conclure que :

- Les premiers essais réalisés pour la résolution du butan-2-ol ont montré une relativement faible sélectivité de la lipase.
- Cette faible sélectivité est due au manque d'encombrement du substrat de départ : les groupements méthyle et éthyle du butan-2-ol peuvent indépendamment pénétrer dans la poche stéréospécifique, entraînant une non-spécificité de la réaction (Figure 9).

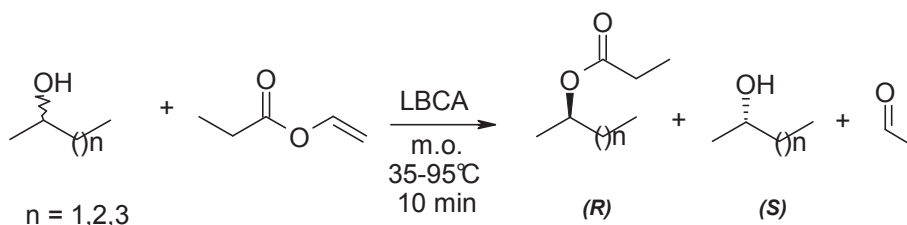


Schéma 64 : Résolution d'alcools secondaires par la lipase B de *Candida antarctica*

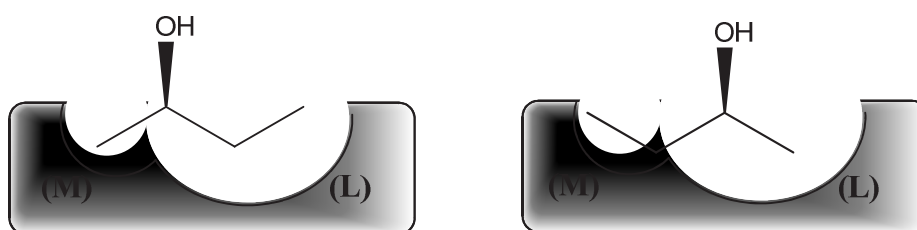


Figure 9 : Positionnements possibles du butan-2-ol dans le site actif de la lipase permettant la catalyse des deux énantiomères. (M) représente la poche stéréospécifique de l'enzyme et L la poche large

Par augmentation de la taille de la chaîne carbonée, la discrimination entre les énantiomères est accentuée par des raisons stériques (Figure 10).

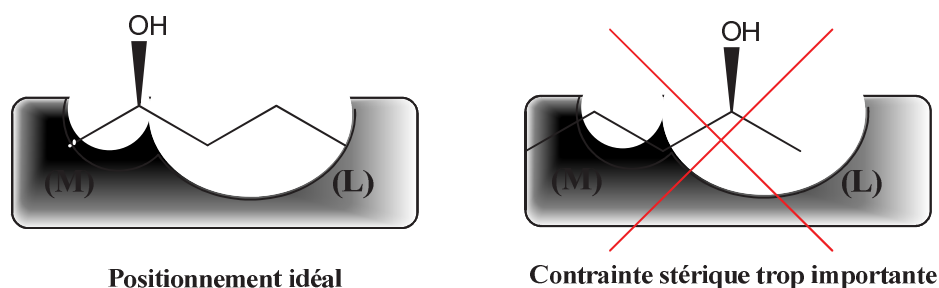


Figure 10 : Gêné stérique induite par un mauvais positionnement de l'hexan-2-ol

En conclusion, les deux technologies (en réacteur solide/gaz ou sous irradiation micro-onde) permettent une résolution efficace d'alcools secondaires à longue chaîne avec une excellente sélectivité, allant jusqu'à $E > 295$ pour la résolution de l'hexan-2-ol. Par utilisation du chauffage sous irradiation micro-onde, le comportement de la lipase a pu être étudié au sein de liquides ioniques, tâche impossible en réacteur solide gaz du fait de la trop faible tension de vapeur de ces solvants.

Cette étude nous a permis de distinguer des paramètres importants lors de ces résolutions :

- Le facteur température,
- Le choix du solvant,
- L'importance d'imposer une contrainte stérique forte pour une bonne sélectivité enzymatique.

Dans le but de synthétiser de nouveaux précurseurs chiraux plus complexes, nous nous sommes concentrés sur la résolution, sous irradiation micro-onde de composés d'intérêt de type α -hydroxycarbonyles.

PARTIE II. Synthèse et résolution de α -hydroxyamides chiraux

Les α -hydroxyamides appartiennent à une classe de composés présents en grand nombre dans la nature. Ils possèdent plusieurs d'applications biologiques (Tableau 23).

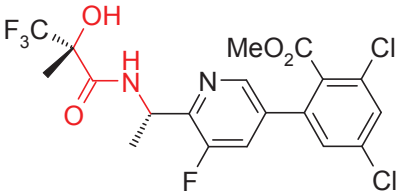
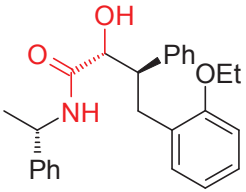
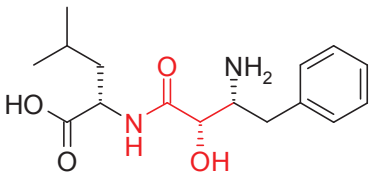
Molécule	Effet
	Antagoniste du récepteur à la Bradykinine
	Inhibiteur de la noreadrénaline
	Inhibiteur d'aminopeptidase

Tableau 23 : Exemples d' α - et β -hydroxyamides chiraux ayant une activité biologique

Leur obtention et leur résolution demeurent un véritable challenge en synthèse organique.

- Antagoniste du récepteur à la Bradykinine

La bradykinine est une hormone peptidique impliquée dans les mécanismes de la douleur et de l'inflammation. Couplée à une protéine G, les récepteurs B1 et B2 de la bradykinine sont activés par la bradykinine, la kallidine (lys-bradykinine) ou par leurs dérivés cataboliques immédiatement après une blessure¹⁴⁰. Des molécules peptidiques puis non-peptidiques ont été synthétisées comme antagonistes sélectifs aux récepteurs B1 et B2, comme les indazoles¹⁴¹, l'aspirine¹⁴² ou les arylsulfamides¹⁴³.

Parmi les dérivés non-peptidiques, les motifs α -hydroxyamides non chiraux sont retrouvés dans des dérivés pyridiniques comme une alternative viable aux dérivés de cyclopropylamines (Figure 11)¹⁴⁴.

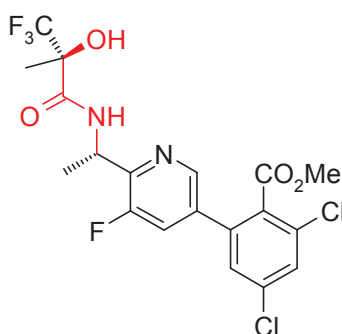


Figure 11 : Structure d'un dérivé α -hydroxyamide chiral antagoniste du récepteur à la Bradikynine

Leurs analogues tétrazoles ont été synthétisés par l'équipe de Kuduk. Ces composés affichent une activité de l'ordre du subnanomolaire (0,439 nM), et leurs multiples voies de dégradation métabolique empêchent des interactions médicamenteuses (Figure 12)¹⁴⁵.

¹⁴⁰ Ahluwalia A., Perretti M. B1 receptors as a new inflammatory target. Could this B be the 1?. *Trends in pharmacological sciences*. **1999**, 20, 99-103.

¹⁴¹ Bodmer-Narkevitch V., Anthony N., Cofre V., Jolly S., Murphy K., Ransom R., Reiss D., Tang C., Thomayant Prueksaritanont T., Pettibone D., Bock M., Kuduk S. Indazole derivatives as novel bradykinin B1 receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, 20, 7011-7014.

¹⁴² Gardes J., Michineau S., Pizard A., Alhenc-Gelas F., Rajerison R. Aspirin inhibits human bradykinin B2 receptor ligand binding function. *Biochemical Pharmacology*. **2008**, 75, 1807-1816.

¹⁴³ Liu Q., Qian W., Li A., Biswas K., Chen J., Fotsch C., Han N., Yuan C., Arik L., Biddlecome G., Johnson E., Kumar G., Lester-Zeiner D., Ng G., Hungate R., Askew B. Aryl sulfonamides containing tetralin allylic amines as potent and selective bradykinin B1 receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, 20, 4593-4597.

¹⁴⁴ Wood M., Schirripa K., Kim J., Kuduk S., Chang R., Di Marco C., Di Pardo R., Wan B., Murphy K., Ransom R., Chang R., Holahann M. α -Hydroxy amides as a novel class of bradykinin B1 selective antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, 18, 716-720.

¹⁴⁵ Kuduk S., Chang R., DiPardo R., Di Marco C., Murphy K., Ransom R. Bradykinin B1 receptor antagonists: An α -hydroxy amide with an improved metabolism profile. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, 18, 5107-5110.

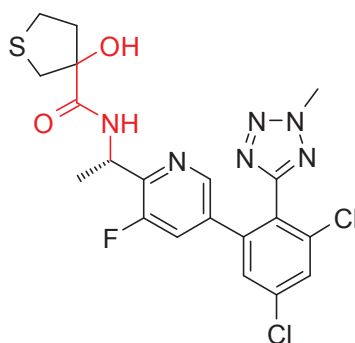


Figure 12 : Structure d'un dérivé tétrazole antagoniste à la bradykinine

- Inhibiteur d'aminopeptidase.

La bestatine est connue pour être un hydroxyamide chiral impliqué dans l'inhibition de l'aminopeptidase, une glycoprotéine de 150 kDa, relarguée dans la matrice extracellulaire provoquant l'inflammation des tissus ¹⁴⁶. La bestatine affiche un effet important sur l'inhibition compétitive de l'aminopeptidase, diminuant ainsi son activité protéolytique. Cette molécule, pouvant être synthétisée au départ de la proline et de la leucine est notamment responsable de l'inhibition de l'effet d'inflammation ¹⁴⁷ (Figure 13).

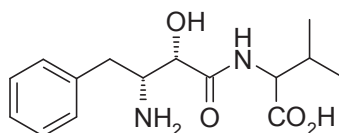


Figure 13 : Structure de la bestatine

Récemment, la synthèse de la bestatine a été réalisée au départ d'un groupement leucine greffé sur une résine de type Wang directement couplée à l'hydroxyacide chiral (Schéma 65)

148

¹⁴⁶ Lkhagvaa B., Tani K., Sato K., Toyoda Y., Suzuka C., Sone S. Bestatin, an inhibitor for aminopeptidases, modulates the production of cytokines and chemokines by activated monocytes and macrophages. *Cytokine*. **2008**, 44, 386-391.

¹⁴⁷ George S., Suryavanshi G., Sudalai A. A short enantioselective synthesis of (-)-bestatin via l-proline-catalyzed α -amination of an aldehyde. *Tetrahedron Letters*. **2008**, 49, 6791-6793.

¹⁴⁸ Velmourougane G., Harbut M., Dalal S., McGowan S., Oellig C., Meinhardt N., Whisstock J., Klemba M., Greenbaum D. Synthesis of New (-)-Bestatin-Based Inhibitor Libraries Reveals a Novel Binding Mode in the S1 Pocket of the Essential Malaria M1 Metalloaminopeptidase. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, 54, 1655-1666.

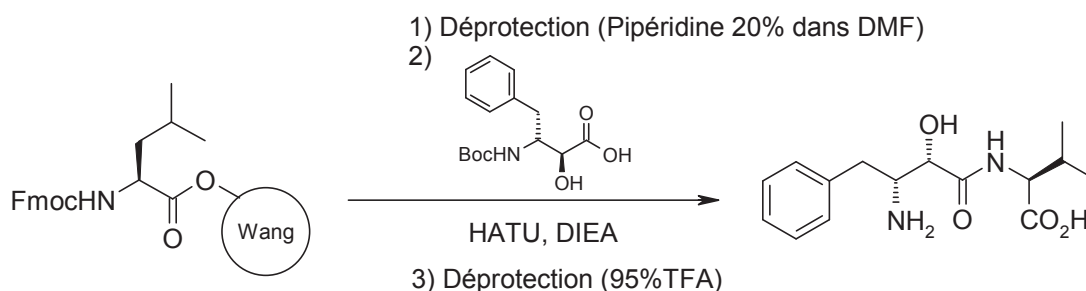


Schéma 65 : Synthèse de la Bestatine par couplage peptidique

Des tests de toxicité sur des parasites pathogènes de *Plasmodium falciparum*, responsable de la malaria, ont montré une activité inhibitrice IC₅₀ de 3.2 μM et une constante d'inhibition de 190 nM pour la metalloaminopeptidase (Pfa-M1), enzyme jouant un grand rôle dans l'infection du parasite ¹⁴⁹.

PARTIE III. Résolution du mandélate de méthyle biocatalysée par des lipases sous irradiation micro-onde

Les dérivés hydroxyamides asymétriques recherchés peuvent être obtenus au départ d'un précurseur chiral lui-même provenant de la résolution enzymatique d'α-hydroxyesters racémiques (Schéma 66).

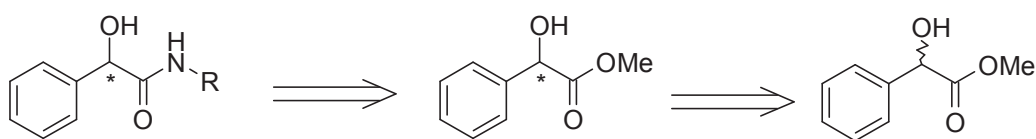


Schéma 66 : Obtention d'un α-hydroxyamide chiral par résolution énantiosélective du mandélate de méthyle

¹⁴⁹ Dalal S., Klemba M. Roles for two aminopeptidases in vacuolar hemoglobin catabolism in *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*. **2007**, 282, 35978–35987.

I. Le mandélate de méthyle : molécule ubiquitaire en synthèse organique

1. Le mandélate de méthyle en tant que précurseur de dérivés γ - et β -lactames

Les dérivés β -lactames sont des molécules synthétisées par les mycètes et les bactéries Gram + et Gram- et sont notamment utilisés en tant qu'antibiotiques¹⁵⁰. Découverts en 1929 par Fleming, les antibiotiques comme les pénicillines ou les céphalosporines sont industriellement produits par *Penicillium chrysogenum* et *Acremonium chrysogenum*¹⁵¹. La synthèse chimique de ces dérivés peut néanmoins être réalisée par catalyse chimique ou enzymatique.

- Synthèse conventionnelle de β -lactames

Différentes synthèses chimiques pour la formation du cycle β -lactame peuvent être employées comme l'utilisation d'imines condensées à des cétènes. L'obtention de cycles β -lactames par réaction de Staudinger, est induite par la condensation d'un aldéhyde et d'une imine. Cette réaction requiert des catalyseurs à base d'imidazole ou de triazole¹⁵² (Schéma 67).

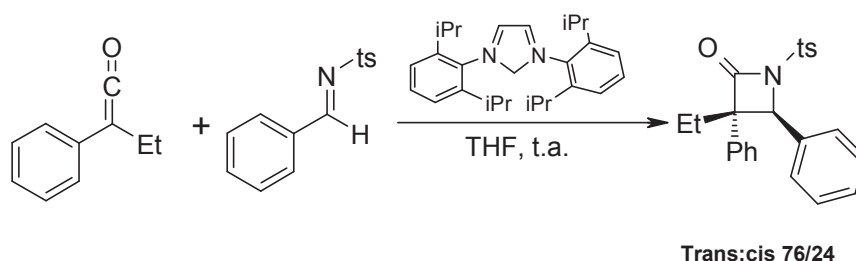


Schéma 67 : Formation d'un cycle β -lactame par réaction de Staudinger

¹⁵⁰ Berg. Functional characterisation of penicillin production strains. *Fungal Biology Reviews*. **2010**, 24, 73-78.

¹⁵¹ Brakhage A., Thön M., Spröte P., Scharf D., Al-Abdallah Q., Wolke S., Hortschansky P. Aspects on evolution of fungal β -lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry*. **2009**, 1801-1811.

¹⁵² Tang K., Wang J., Hou Q., Cheng X., Liu Y. Computational predictions on the stereoselectivity carbene catalyzed β -lactam synthesis. *Tetrahedron : asymmetry*. **2011**. doi:10.1016/j.tetasy.2011.05.019.

Le rapport *trans/cis* n'excède cependant pas 76/24 en utilisant directement un catalyseur chiral.

- Utilisation du mandélate de méthyle en tant que précurseur de cycle β -lactames à deux centres asymétriques

L'utilisation du mandélate de méthyle protégé, déjà énantiomériquement résolu, permet de s'affranchir de cette limitation. L'équipe de Kobayashi a réalisé la synthèse de dérivés β -lactames par contrôle de deux centres asymétriques, en réalisant, au départ du mandélate de méthyle de configuration (*R*) la synthèse du cycle β -lactame avec un rendement global de 11% et contrôle total de la sélectivité¹⁵³. Après protection, et cyclisation, des dérivés β -lactames diversement substitués sont obtenus (Schéma 68).

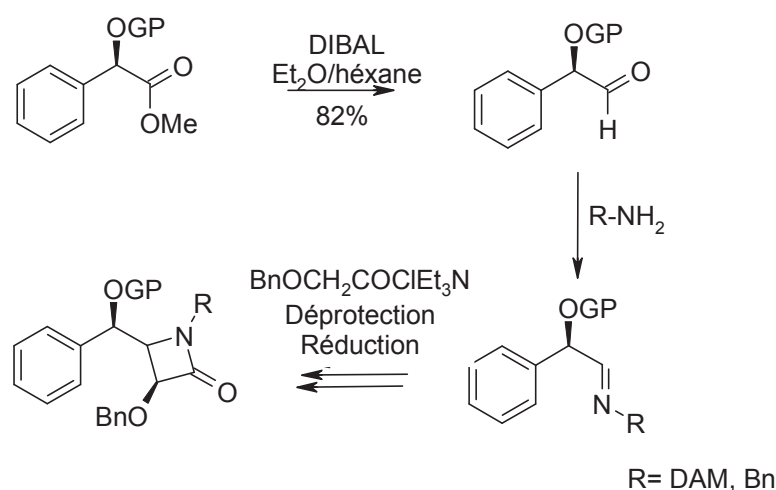


Schéma 68 : Synthèse de dérivés β -lactames

2. Synthèse et utilisation de cycles γ -lactames

Devant la résistance des pathogènes aux antibiotiques, les γ -lactames ont été utilisés comme molécules analogues aux β -lactames. Afin de réaliser ces précurseurs chiraux, l'acide mandélique de configuration (*R*) peut être utilisé (Schéma 69).

¹⁵³ Kobayashi Y., Takemoto Y., Kamijo T., Harada H., Ito Y., Terashima S. A stereoselective synthesis of the (*2R, 3S*)- and (*2S, 3R*)-3-amino-2-hydroxybutyric acid derivatives, the key components of a renin inhibitor and bestatin. *Tetrahedron*. **1992**, 48, 1853-1868.

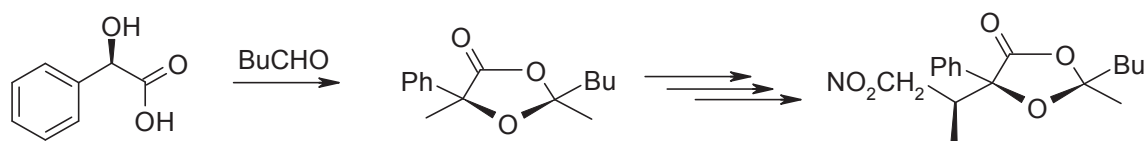


Schéma 69 : Synthèse de dérivés γ -lactames

La synthèse de ces dérivés est réalisée par lactonisation intramoléculaire suivie d'une réaction de Michael. Par ce procédé, les γ -lactames sont obtenus avec un rendement de 70%, et avec un rapport de diastéréomères de 85/15¹⁵⁴.

3. Synthèse de dérivés γ -aminobutyriques

Les dérivés β et γ -lactames sont utilisés en tant que précurseurs d'analogues de dérivés γ -aminobutyrique. L'altération des récepteurs de ce neurotransmetteur est notamment responsable de la schizophrénie, de la maladie de Parkinson, ou de la maladie d'Alzheimer^{155,156}. Ces dérivés sont aussi connus pour être des inhibiteurs de la rénine, impliquée dans l'hypertension¹⁵⁷.

Au départ des dérivés β -lactames, il est possible d'obtenir les dérivés γ -aminobutyriques correspondants par hydrolyse acide dans l'isopropanol puis par hydrogénation catalytique. L'ester β -hydroxy- γ -amino butyrique est obtenu avec un rendement global de 91% au départ du cycle β -lactame (Schéma 70)¹⁵⁴.

¹⁵⁴ Blay G., Fernández I., Monje B., Pedro J. Diastereoselective Michael addition of (*S*)-mandelic acid enolate to nitroalkenes. Enantioselective synthesis of α -hydroxy- α,β -diaryl- γ -lactams. *Tetrahedron*. **2004**, 60, 165-170.

¹⁵⁵ Geffen Y., Nudelman A., Gil-Ad I., Rephaeli A., Huang M., Savitsky K., Klapper L., Winkler I., Meltzer H., Weizman A. BL-1020: A novel antipsychotic drug with GABAergic activity and low catalepsy, is efficacious in a rat model of schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*. **2009**, 19, 1-13.

¹⁵⁶ Luchetti s., Huitinga i., Swaab d. Neurosteroid and gaba-a receptor alterations in alzheimer's disease, parkinson's disease and multiple sclerosis. *Neuroscience*. **2011**, 191, 6-21.

¹⁵⁷ Ordóñez M., Labastida-Galván V., Lagunas-Rivera S. Stereoselective synthesis of GABOB, carnitine and statine phosphonates analogues. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, 129-147.

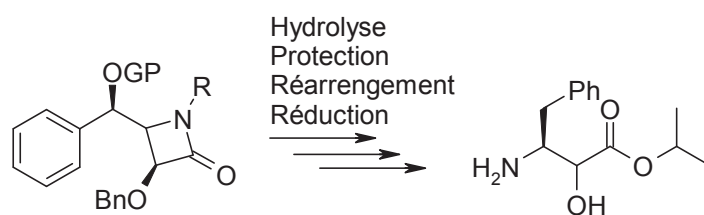


Schéma 70: Synthèse de dérivés aminobutyrique

4. Synthèse de benzoïnes

L'acide mandélique énantio pur est utilisé comme précurseur pour la synthèse de benzoïnes, composé di-aryliques possédant de nombreuses applications en synthèse asymétrique, comme la cyclopropanation sélective ou les réactions de cycloadditions de Diels Alder sélective (Schéma 71) ¹⁵⁸.

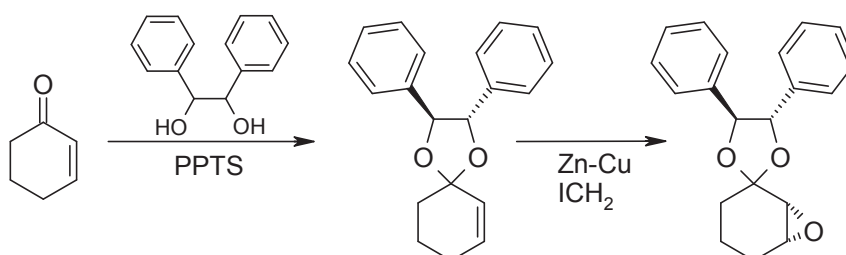


Schéma 71 : Utilisation de la benzoïne dans l'époxydation sélective de la cyclohex-2-ènone

La synthèse de ces benzoïnes et benzoïnes peut être réalisée en plusieurs étapes par condensation du *t*-butanaldéhyde sur l'acide mandélique énantio pur.

Le γ -lactame formé par la cyclisation intramoléculaire sera suivie d'une addition de Michael conduisant à la formation du lactame substitué. Ce dérivé cyclique à 5 chaînons est clivé par hydrolyse suivie d'une décarboxylation oxydante pour conduire à la diaryle hydroxycétone énantio pure, avec un rendement global de 36%, et un excès énantiomérique de 99% (Schéma 72) ¹⁵⁹.

¹⁵⁸ Okano K. Synthesis and application of chiral hydrobenzoin. *Tetrahedron*. **2011**, 63, 2483-2512.

¹⁵⁹ Blay G., Fernández I., Monje B., Montesinos-Magraner M., Pedro J. (S)-Mandelic acid enolate as a chiral benzoyl anion equivalent for the enantioselective synthesis of non-symmetrically substituted benzoin. *Tetrahedron*. **2011**, 67, 881-890.

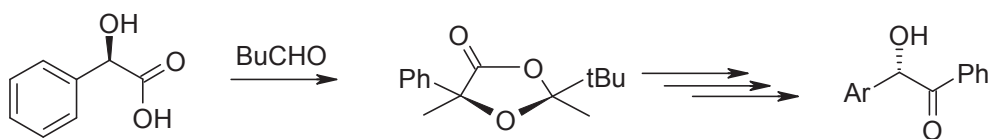


Schéma 72: Synthèse de benzoïnes énantipures

5. Synthèse de dérivés hydroxylactones

Le mandélate de méthyle est un précurseur de diverses lactones ayant des propriétés cytotoxiques contre des lignées cellulaires du cancer du sein ¹⁶⁰. Ces stéryl lactones sont originellement présentes dans les graines de *Goniothalamus amuyon*. Ces lactones peuvent être synthétisées au départ de l'acide mandélique énantipur et peuvent conduire à la formation de la crassalactone (Schéma 73) ¹⁶¹.

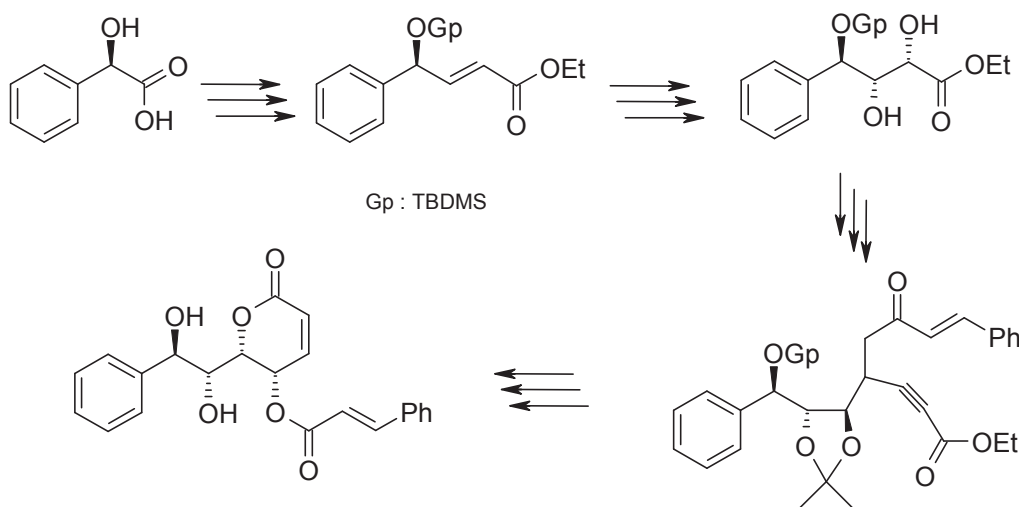


Schéma 73 : Synthèse énantipure de la crassalactone A

La crassalactone A a été synthétisée par l'équipe de Vankateswarlu au départ de la forme (*R*) de l'acide mandélique. Après protection de ce dérivé par un groupement TBDMS, et réaction de Wittig, un ester α - β insaturé est obtenu. Après oxydation de l'alcène en

¹⁶⁰ Tuchinda P., Munyoo B., Pohmakotr M., Thinapong P., Sophasan S., Santisuk T., Reutrakul V. Cytotoxic Styryl-Lactones from the Leaves and Twigs of *Polyalthia crassa*. *Journal of Natural Products*. **2006**, 69, 1728-1733.

¹⁶¹ Shekhar V., Reddy D.K., Suresh V., Babu D.C., Venkateswarlu Y. First total synthesis of (+)-crassalactone A. *Tetrahedron Letters*. **2010**, 51, 946-948.

présence de tétraoxyde d'osmium puis protection du diol, oxydation et couplage de l'acide cinnamique, un dérivé ester alcynique est obtenu. Ce dérivé est ensuite réduit puis hydrolysé pour donner la crassalactone cyclique finale avec un rendement global de 11% sur les 10 étapes et ce, avec un contrôle de la sélectivité au départ de l'acide mandélique.

Le mandélate de méthyle et son dérivé acide mandélique énantio pur sont donc des précurseurs d'intérêt pour l'obtention de nombreuses molécules à activités biologiques (Figure 14).

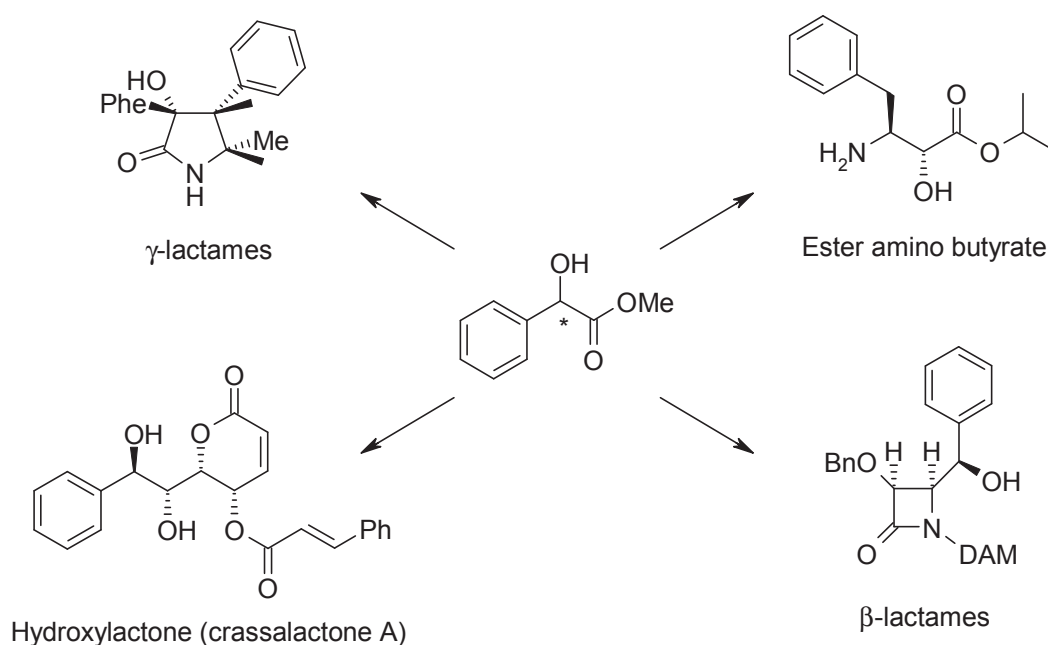


Figure 14 : Multiples utilisations du mandélate de méthyle énantio pur en tant que précurseur de molécules à activités biologiques

II. Synthèse des dérivés mandéliques énantio purs

Pour synthétiser le mandélate de méthyle ou ses dérivés de façon énantio pure, plusieurs stratégies ont été rapportées dans la littérature, que ce soit par oxydation, réduction ou résolution enzymatique.

1. Réduction sélective d'aryldicétones

Les aryldicétones sont des composés pouvant être obtenus facilement dans le commerce. Leur réduction sélective a été réalisée par l'équipe de Saito en présence d'un dérivé dihydronicotinamide et de magnésium en tant que potentiel réducteur (Schéma 74).

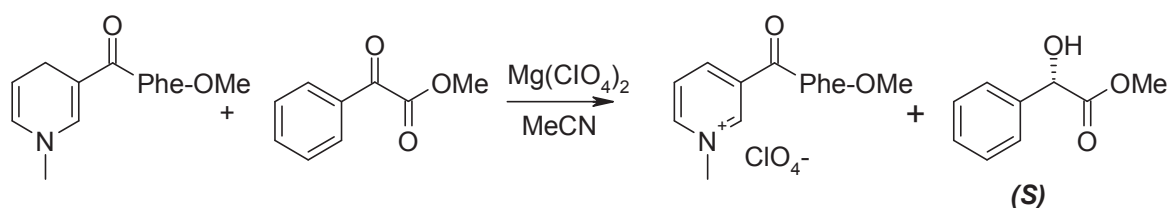


Schéma 74 : Obtention du mandélate de méthyle par réduction sélective

Le mandélate de méthyle de configuration (*S*) ainsi est obtenu pur avec un modeste excès énantiomérique de 33% ¹⁶².

2. Oxydation d'aryldiols

L'oxydation du phénylglyoxal diols en présence d'un catalyseur chiral et d'un dérivé thiophénol, conduit au mandélate de méthyle de configuration (*S*) avec un faible rendement de 35% mais avec un excès énantiomérique satisfaisant de 83% (Schéma 75) ¹⁶³.

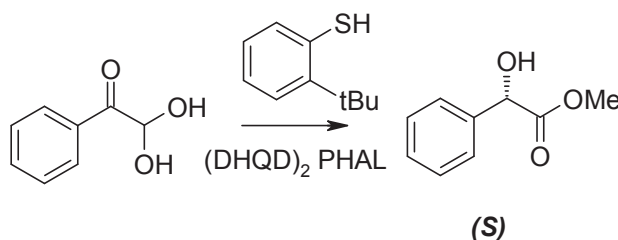


Schéma 75 : Obtention du mandélate de méthyle par oxydation

¹⁶² Saito R, Naruse S, Takano K, Fukuda K, Katoh A, Inoue Y. Unusual temperature dependence of enantioselectivity in asymmetric reductions by chiral NADH models. *Organic Letters*. **2006**, 8, 2067-2070.

¹⁶³ E. Schmitt, I. Schiffers, C. Bolm. Organocatalytic conversion of arylglyoxals into optical active mandelic acid derivatives. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 3185-3188.

3. Résolution du mandélate de méthyle par hydrolyse énantiosélective

Par hydrolyse énantiosélective en présence de la lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme 435), l'équipe de Yadav a synthétisé le mandélate de méthyle (Schéma 76). Les meilleures conditions opératoires correspondent à l'utilisation de 50mg de catalyseur, 0,005 mole de substrat pendant 24 heures dans le *tert*-butanol. Le produit est obtenu avec une conversion modeste de 19%, présente une pureté énantiomérique de 78%¹⁶⁴.

L'hydrolyse réalisée dans des conditions opératoires comparables sous champ micro-onde montre une diminution du temps de réaction d'un facteur de 4,5 avec une augmentation de la sélectivité, avec pureté énantiomérique de 84% et ce, en seulement 4 heures (Schéma 76)¹⁶⁵.

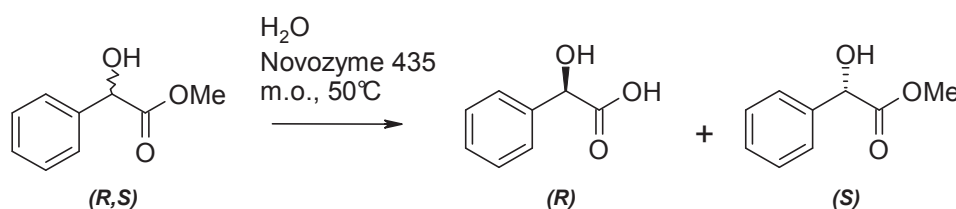


Schéma 76 : Hydrolyse énantiosélective du mandélate de méthyle par le Novozyme 435

4. Synthèse du mandélate de méthyle par utilisation de micro-organismes

Afin d'accéder aux dérivés du mandélate de méthyle chiral, des voies biologiques ont été étudiées par utilisation de micro-organismes¹⁶⁶.

L'équipe de Xia est parvenue à la synthèse du mandélate de méthyle par deux voies distinctes :

- Par hydroxylation du benzyloxyester (Schéma 77), en étudiant le rôle de divers micro-organismes, dont *Helminthosporium sp.* Le mandélate de méthyle de configuration (S) est retrouvé avec un rendement de 63% et un excès énantiomérique de 92%.

¹⁶⁴ Yadav G.D., Sivakumar P. Enzyme-catalysed optical resolution of mandelic acid via (RS)-methyl mandelate in non-aqueous media. *Biochemical Engineering Journal*. **2004**, 19, 101-107.

¹⁶⁵ Yadav G.D., Sajgure A., Dhoot S. Insight into microwave irradiation and enzyme catalysis in enantioselective resolution of RS-(±)-methyl mandelate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **2008**, 83, 1145-1153.

¹⁶⁶ Chen Y., Xu J., Xu X., Xia Y., Lin H., Xia S., Wang L. Enantiocomplementary preparation of (S)- and (R)-mandelic acid derivatives via α -hydroxylation of 2-arylacetic acid derivatives and reduction of α -ketoester using microbial whole cells. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2007**, 18, 2537-2540.

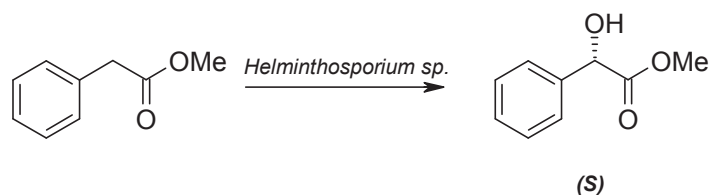


Schéma 77 : Hydroxylation sélective par *Helminthosporium sp.*

-Par réduction sélective d'une phényldicétone en présence de *Geotrichum Candidum*. Le mandélate de méthyle de configuration (*R*) est obtenu avec un rendement de 97% et un excellent excès énantiomérique de 94% (Schéma 78).

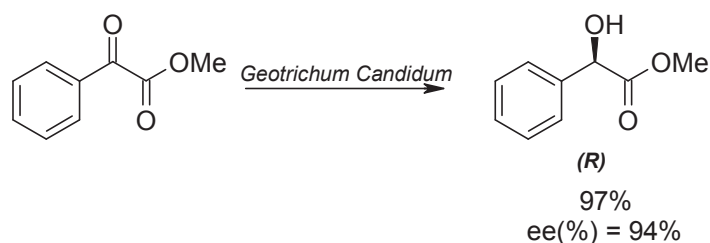


Schéma 78 : Réduction sélective de diones par des micro-organismes

La réduction sélective de cette dione peut être faite par déracémisation directe en présence de déshydrogénases¹⁶⁷ ou de levures¹⁶⁸.

Cependant, toutes ces méthodes biologiques nécessitent la mise en œuvre de cultures cellulaires (entre 48 et 72 heures), et affichent des temps réactionnels relativement long (24h). C'est pourquoi, l'utilisation d'enzymes isolés peut permettre une obtention plus efficace du mandélate de méthyle.

Dans la continuité de notre étude portant sur une meilleure compréhension des réactions de biocatalyse assistées par micro-onde, nous nous sommes intéressés à la résolution du mandélate de méthyle en présence de lipases.

¹⁶⁷Bodlener A., Glueck S., Nestl B., Gruber C., Baudendistel N., Hauer B., Kroutil W., Faber K. Biocatalytic racemization of α -hydroxycarboxylic acids using a stereo-complementary pair of α -hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Tetrahedron*. **2009**, 65, 7752-7755.

¹⁶⁸Dąbkowska K., Szewczyk K. Influence of temperature on the activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase in the kinetic resolution of mandelic acid enantiomers. *Biochemical Engineering Journal*. **2009**, 46, 147-153.

PARTIE IV. Etude comparative de la résolution du mandélate de méthyle en chauffage classique et sous irradiation micro-onde par utilisation de lipases

Le mandélate de méthyle se comporte, en théorie, à la fois comme un donneur d'acyle par sa fonction ester méthylique et comme nucléophile, par sa fonction hydroxyle susceptible d'attaquer l'acyl-enzyme (Figure 15).

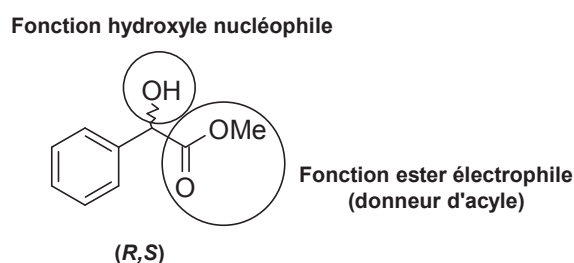


Figure 15 : Utilisation du mandélate de méthyle comme nucléophile ou comme donneur d'acyle

En présence d'un tel α -hydroxyester, la lipase est susceptible d'utiliser cette molécule comme nucléophile et comme électrophile en fonction des conditions opératoires appliquées, mais surtout en fonction du substrat avec lequel l'enzyme va réagir.

Le mandélate de méthyle se comporte comme un donneur d'acyle en présence d'un substrat nucléophile, et comme un nucléophile en présence d'un donneur d'acyle. Il est important de noter, que, dans toutes les réactions de la littérature, aucune ne mentionne l'auto-condensation du substrat avec les lipases ou encore la formation du dimère sans ajout d'un second substrat.

Les deux types d'attaques possibles du mandélate de méthyles étudiés pour une résolution efficace sous microonde sont :

- l'amidification en présence d'amines primaires nucléophiles,
- la *O*-acétylation en présence d'un donneur d'acyle.

Les objectifs de ces réactions de biocatalyse assistées par microonde sont, comme précédemment de :

- Mieux comprendre et optimiser l'énantiosélectivité de lipases.

- Diminuer les temps de réaction.
- Etudier le comportement des enzymes en conditions « extrêmes », c'est à dire dans une gamme de température très large.

I. Résolution du mandélate de méthyle par amidification

La résolution du mandélate de méthyle par amidification en présence de butylamine et de lipase B de *Candida antarctica* a été précédemment rapportée dans la littérature. Le fait remarquable décrit est un changement complet de l'énantiopréférence de la lipase en fonction du type système de solvant choisi (Schéma 79) ¹⁶⁹.

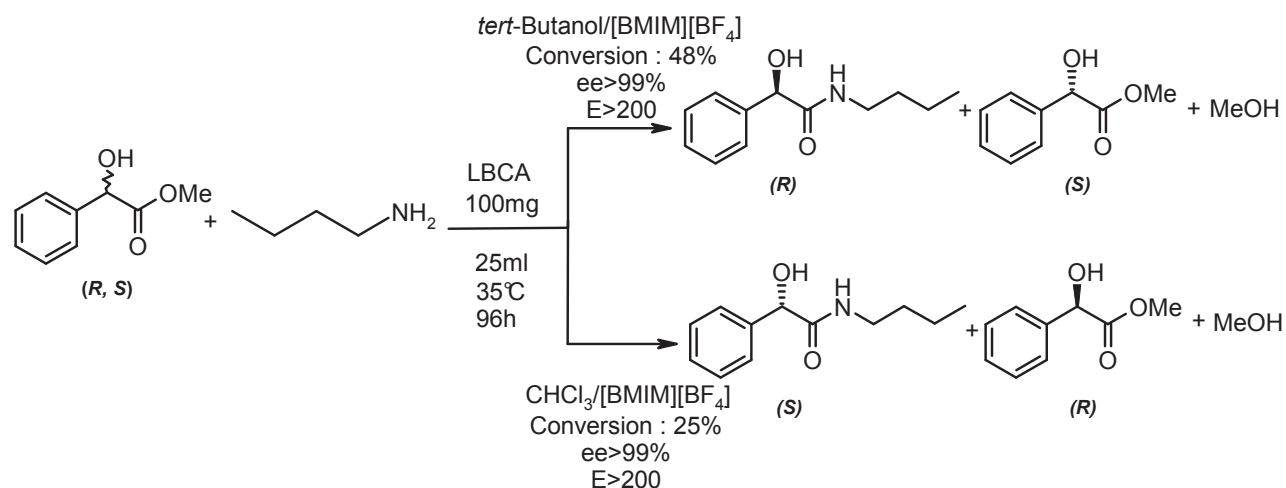


Schéma 79 : Amidification énantiosélective du mandélate de méthyle par la lipase B de *Candida antarctica*

Le *N*-butyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide ainsi formé, ne présente cependant que peu d'intérêt au niveau biologique.

Pour notre part, nous avons étudié l'optimisation de la résolution du mandélate de méthyle par amidification biocatalysée sous irradiation micro-onde en utilisant l'allylamine, une amine primaire insaturée (Schéma 80).

¹⁶⁹ Pilissão C., Nascimento M. Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (*RS*)-methyl mandelate catalyzed by lipases. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2006**, 17, 428-433.

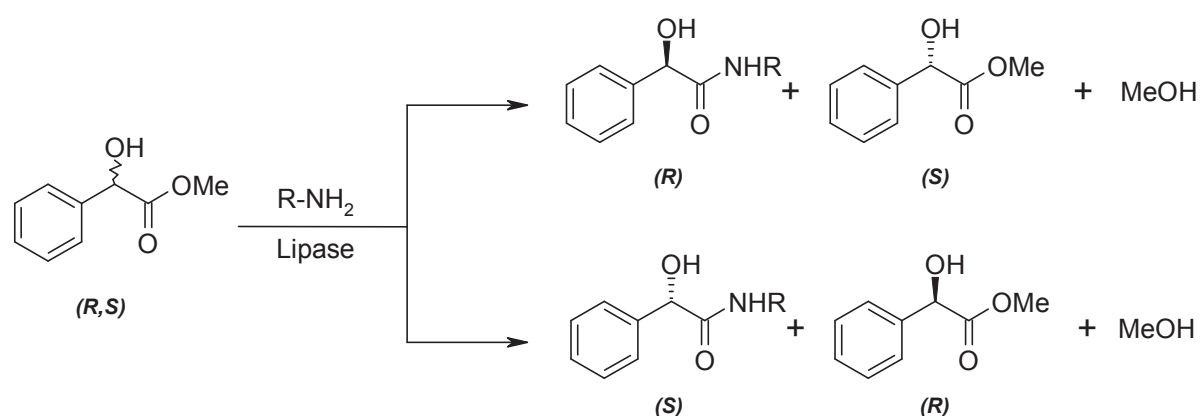


Schéma 80 : Stratégie de résolutions du mandélate de méthyle biocatalysées par des lipases par amidification énantiosélective

Cette stratégie repose sur l'utilisation du mandélate de méthyle en tant que donneur d'acyle. L'attaque de l'amine primaire sur le mandélate de méthyle, stabilisé dans le site actif, provoquera la formation de l'hydroxyamide voulu. Dans cette réaction la stéréopréférence de la lipase peut conduire à la formation de l'hydroxyamide de configuration (*R*) ou (*S*). La règle de Kazlauskas est ici difficile à appliquer car les substrats sont bien plus complexes que les alcools secondaires linéaires précédemment employés.

Lors de cette réaction, du méthanol est libéré pouvant théoriquement conduire à la réversibilité de la réaction. Il va donc falloir montrer l'irréversibilité de la réaction, afin de pouvoir calculer les ratios énantiomériques.

Le but de cette étude est donc de déterminer l'énantio-préférence de la lipase et optimiser les paramètres réactionnels pour accroître la résolution enzymatique.

1. Choix de l'amine primaire

Le choix de l'allylamine en tant que nucléophile a été motivé du fait de son intérêt dans la synthèse de précurseurs comme les pyrrolidinones chirales, notamment utilisables comme précurseurs d'oxyoxazolidinones (Figure 16)^{170,171}.

¹⁷⁰ Omata Y., Kakehi A., Shirai M., Kamimura A. Stereoselective formation of optically active 2-oxy-1,3-oxazolidin-4-ones and an efficient synthesis of optically active secondary 2-pyrrolidones. *Tetrahedron Letters*. **2002**, 43, 6911-6914.

¹⁷¹ Kamimura A., Tanaka K., Hayashi T., Omata Y. A convenient synthesis of medium-sized lactams through RCM reaction of oxyoxazolidinones. *Tetrahedron Letters*. **2006**, 47, 3625-3627.

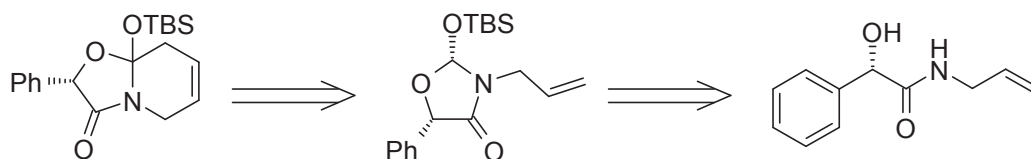


Figure 16 : Synthèse de pyrrolidinones chirales

Les pyrrolidinones chirales peuvent être retrouvées comme précurseurs d'agents antibactériens ou comme auxiliaires chiraux^{172,173}.

1. Synthèse des étalons α -hydroxyamides chiraux énantio purs

Afin de pouvoir calibrer la chromatographie en phase gazeuse et permettre l'analyse exacte des composés, la synthèse des étalons énantio purs par amidolyse au départ de synthons chiraux commerciaux a été entreprise par voie chimique ou enzymatique.

1. Synthèse des α -hydroxyamides énantio purs par voie chimique

Les α -hydroxyamides ont été synthétisés au départ des (*R*)- et (*S*)-mandélates de méthyle commerciaux. La réaction a été conduite dans le trifluorotoluène pendant 2h à 200°C, sous irradiation micro-onde en système fermé en absence de catalyseur (Schéma 81).

¹⁷² Anwar M., Cowley A., Moloney M. Novel chiral pyrrolidinone scaffolds derived from threonine with antibacterial activity. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, 21, 1758-1770.

¹⁷³ Dambacher J., Anness R., Pollock P., Bergdahl M. Highly diastereoselective conjugate additions of monoorganocopper reagents to chiral imides. *Tetrahedron*. **2004**, 60, 2097-2110.

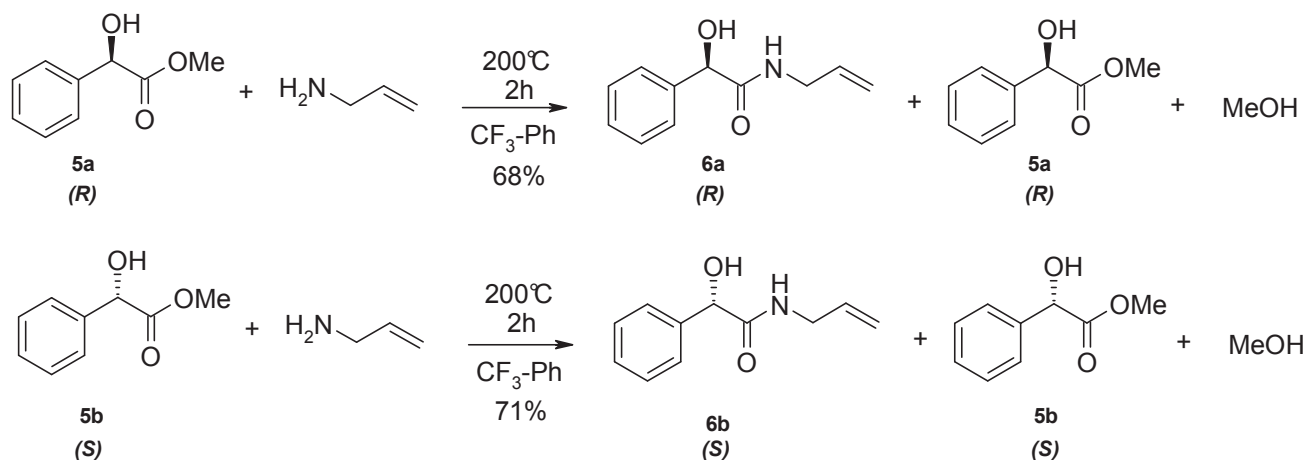


Schéma 81 : Synthèse des (R) et (S)-N-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamides par voie chimique.

A cette température, l'auto-condensation du mandélate de méthyle est observée sans dégradation des réactifs de départ. Le (R)-N-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) et l'énantiomère (S) (**6b**) sont obtenus indépendamment avec des rendements respectifs de 68%, et de 71% au départ d'étalons énantiopurs commerciaux (**5a**) et (**5b**) (Schéma 81).

2. Synthèse des énantiomères α -hydroxyamides par catalyse enzymatique

Pour avoir de déterminer l'énantiopréférence de la lipase B de *Candida antarctica*, les amides (**6a**) et (**6b**) ont également été synthétisés au départ des énantiopurs commerciaux (R) et (S) à température ambiante au sein du *tert*-butanol (25mL) pendant 48 heures (Schéma 82).

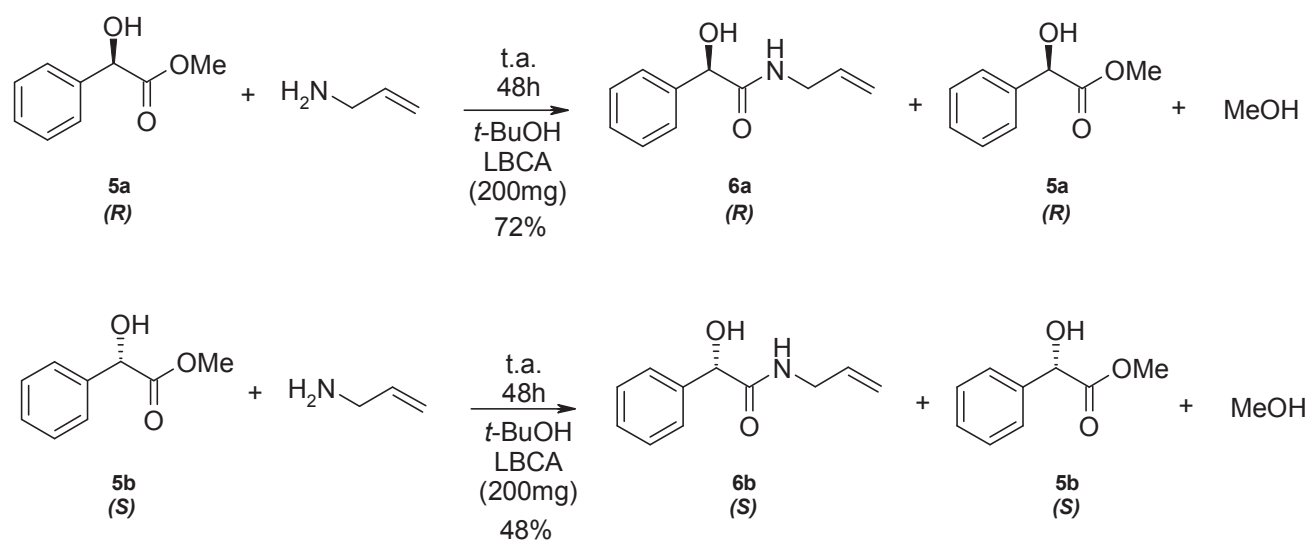


Schéma 82 : Synthèse des α -hydroxyamides énantio-purs (*R*) et (*S*), par utilisation de la lipase B de *Candida antarctica*

L' α -hydroxyamide de configuration (*R*) (**6a**) est obtenu avec un rendement de 72% et son énantiomère (*S*) (**6b**) avec un rendement de 48%.

Il est à noter que dans ces conditions, la lipase B de *Candida antarctica* est capable de catalyser l'amidification à température ambiante des deux énantiomères, avec une plus grande activité pour l'énantiomère (*R*).

Ce premier résultat en milieu non conventionnel nous conforte pour une énantio-préférence pour l'énantiomère (*R*) du mandélate de méthyle, étant donné qu'une meilleure catalyse est observée pour cet énantiomère.

2. Mesure des pouvoirs rotatoires

Pour s'assurer de la pureté optique de tous nos composés, les valeurs polarimétriques des *N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamides énantio-purs (**6a** et **6b**), obtenus par voie chimique et enzymatique ont été comparées à celles retrouvées dans la littérature (Tableau 24)

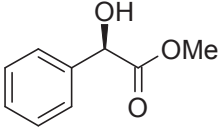
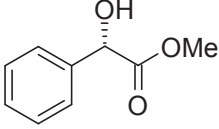
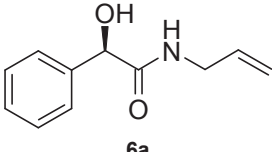
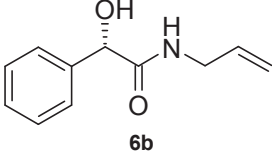
Molécule	$[\alpha]_D$ exp.	$[\alpha]$ litt. (ref)
 5a	-142° (c=1,0, MeOH)	-143° (c=1.0, MeOH) ¹⁷⁴
 5b	+142° (c=1,0 MeOH)	+143° (c=1.0 MeOH) ¹⁷⁵
 6a	-69.7° (c=1,2 CHCl ₃)	-
 6b	+70.0° (c=1,2 CHCl ₃)	+70.4 (c=1.2 CHCl ₃) ¹⁷⁶

Tableau 24 : Comparaison des valeurs polarimétriques obtenues expérimentalement avec la littérature

Les valeurs expérimentales sont conformes avec celles de la littérature. Les α -hydroxyamides chirales pourront être utilisées comme molécules étalons.

3. Détermination et optimisation de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse

Afin de quantifier la quantité de mandélate de méthyle utilisée par la lipase, nous avons utilisé l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Par l'équation $A=k*m$, où A représente l'aire du pic de chromatographie, k, la capacité de la colonne et m la masse de produit injecté, il est possible de déterminer précisément la

¹⁷⁴ Zeror S., Collin J., Fiaud J.C., Zouiouche L. Enantioselective ketoester reductions in water: a comparison between microorganism- and ruthenium-catalyzed reactions. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, 21, 1211-1215.

¹⁷⁵ Chadha A., Baskar B. Biocatalytic deracemisation of α -hydroxy esters: high yield preparation of (*S*)-ethyl 2-hydroxy-4-phenylbutanoate from the racemate. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2002**, 13, 1461-1464.

¹⁷⁶ Kamimura A., Omata Y., Tanaka K., Shirai M. Oxyoxazolidinone as an auxiliary for heterocyclic synthesis. Enantioselective formation of *N*-unprotected 2-pyrrolidones from selenocarboxylate and allylamines via radical cyclization. *Tetrahedron*. **2003**, 59, 6291-6299.

quantité de mandélate de méthyle non utilisée par la lipase, et donc la conversion enzymatique.

Afin de déterminer la capacité (k) de la colonne, il est nécessaire de faire une gamme étalon du mandélate de méthyle (Figure 17).

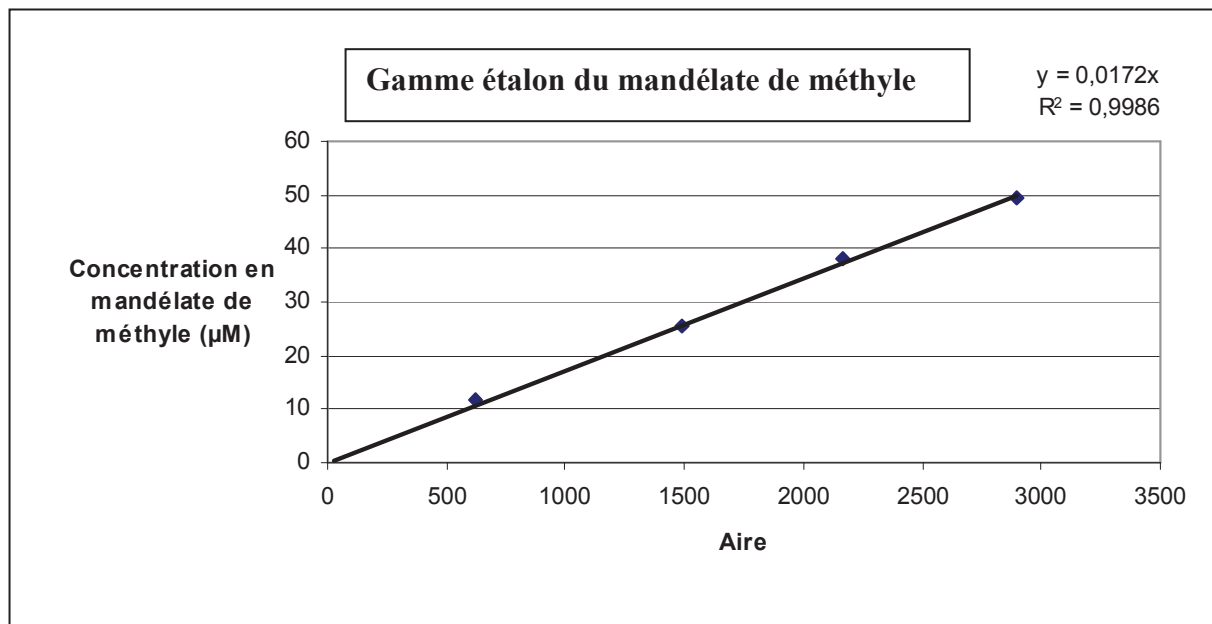


Figure 17 : Courbe étalon du mandélate de méthyle observée par chromatographie en phase gazeuse

Le coefficient de corrélation issu de la droite de régression linéaire étant très élevé ($R^2 = 0.9986$) le taux de conversion enzymatique sera obtenu de manière précise.

Le taux de conversion enzymatique (en %) sera donc de $100 - A * 0.0172$, ou A est l'aire correspondant au mandélate de méthyle retrouvé par chromatographie phase gaz et 0.0172 la capacité de la colonne calculée grâce à la gamme étalon.

Afin de conforter le résultat, le taux de conversion enzymatique a aussi été déterminé par la formule (Equation 3).

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \%$$

Équation 3 : Calcul du taux de conversion enzymatique en prenant compte des excès énantiomériques de substrat et de produit

c correspond au taux de conversion, ee_s à l'excès énantiomérique de mandélate de méthyle et ee_p à l'excès énantiomérique du *N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide.

4. Détermination de l'irréversibilité de la réaction

Afin de valider la synthèse enzymatique, il est nécessaire de s'affranchir de la réversibilité de la réaction.

Pour ce faire, nous avons fait réagir le *N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide racémique (**6**) avec la lipase B de *Candida antarctica* dans le méthanol, à t.a. pendant 48 heures (Schéma 83).

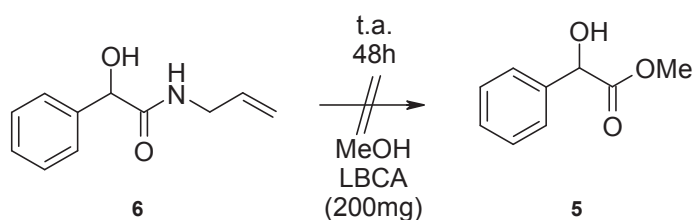


Schéma 83 : Irréversibilité de la réaction entre l'α-hydroxyamide **6** et le méthanol

Si aucune trace de mandélate de méthyle n'est repérée que ce soit par CPG ou après purification, nous pouvons, calculer le paramètre *E* par les équations suivantes (Equation 4).

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1+ee_s)]}{\ln[(1-c)(1-ee_s)]} \text{ ou } E = \frac{\ln[1-c(1+ee_p)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]} \text{ ou } E = \frac{\ln[(1-ee_s)(1+ee_s/ee_p)]}{\ln[(1+ee_s)/(1+ees/ee_p)]}$$

Équation 4 : Détermination du ratio énantiomérique de la lipase

5. Etude de l'influence de la température lors de la résolution du mandélate de méthyle sous irradiation micro-onde

L'un des paramètres déterminants pour une bonne résolution enzymatique est bien évidemment le type de biocatalyseur utilisé. Toutes les lipases ne sont pas aussi efficaces pour une même résolution.

Nous avons donc, envisagé l'utilisation de diverses préparations de lipases, immobilisées ou non. Pour cette amidification, les lipases *Pseudomonas cepacia* et *Candida*

antarctica ont été choisies, notre choix étant motivé par les données de la littérature pour des réactions d'amidification^{177,178}.

1. Etude de l'amidification énantiosélective sous irradiation micro-onde en utilisant les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*

Afin d'identifier l'enzyme le mieux adapté pour cette réaction, différents essais d'amidification ont été réalisés de départ de préparations d'enzymes de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* sous formes libre et immobilisée. Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 26).

Enzyme	Lot	Activité	Immobilisation
LBCA-libre	1316016	11 600 U/g	-
LBCA supportée	077K1155	>10 000 U/g	Résine acrylique
PS-libre	02218A11	>30 000 U/g	-
PS-supportée	MKBB3465	>500 U/g	Terre de diatomée

Tableau 25 : Caractéristiques des lipases utilisées

Les amidifications ont été réalisées en chauffage classique ou sous irradiation micro-onde dans le trifluorotoluène à 50°C (Schéma 84 et Tableau 26).

¹⁷⁷ Thvedt T., Fuglseth E., Sundby E., Hoff B. Enantioenriched 1-aryl-2-fluoroethylamines. Efficient lipase-catalysed resolution and limitations to the Mitsunobu inversion protocol. *Tetrahedron*. **2010**, 66, 6733-6743.

¹⁷⁸ Dhake K., Qureshi Z., Singhal R., Bhanage B. *Candida antarctica* lipase B-catalyzed synthesis of acetamides using [BMIM(PF₆)] as a reaction medium. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 2811-2814.

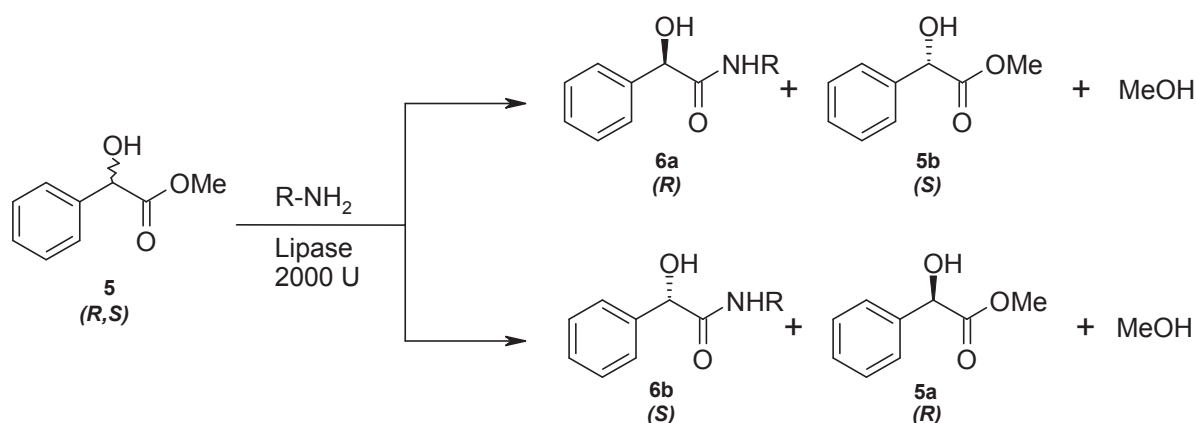


Schéma 84 : Résolution du mandélate de méthyle en utilisant diverses lipases

Enzyme	Ester ee _s (%)	Amide ee _p (%)	c (%)
LBCA-libre	-	-	-
LBCA supportée	18	70	43
PS-libre	-	-	-
PS-supportée	3.5	N.D.	7.5

Tableau 26 : Excès énantiomériques obtenus lors de l'amidification du mandélate de méthyle à 50 °C, dans le trifluorotoluène

Quelles que soient les conditions expérimentales suivies, aucun produit n'est repéré avec les formes libres des deux enzymes.

Une grande différence d'efficacité de catalyse est observée en utilisant les formes immobilisées des lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*.

Par l'emploi de la forme immobilisée de *Pseudomonas cepacia*, une très faible sélectivité de 3,5 % et un très faible rendement de 7,5% sont observés.

Par contre, la lipase B de *Candida antarctica* semble être un enzyme bien mieux adapté pour cette amidification. Un bon taux de conversion de 43% est observé avec une sélectivité d'amide satisfaisante de 70%.

Bien que la structure moléculaire de la lipase de *Pseudomonas cepacia* soit très proche de la lipase B de *Candida antarctica*, une grande différence d'activité entre les deux enzymes est remarquée¹⁷⁹.

Immobilisée, la lipase B de *Candida antarctica* est donc plus efficace dans cette amidification énantiosélective, cet enzyme sera donc utilisé pour les réactions d'amidification dans les études suivantes.

2. Etude de l'amidification énantiosélective du mandélate de méthyle par l'étude comparative des solvants

Le choix d'un solvant adéquat est vital pour une bonne catalyse enzymatique. En conditions classiques, il faut choisir un solvant assez polaire pour obtenir une bonne solubilité des substrats, sans pour autant provoquer la déshydratation de la lipase.

Une grande force de la lipase B de *Candida antarctica* est la large gamme de solvant organique pour réaliser des résolutions^{180,181}.

Pour mener notre étude sous irradiation micro-onde, nous avons décidé d'employer un solvant protique polaire et un solvant aprotique polaire.

La bonne montée en température sous irradiation micro-onde est intimement liée à la constante diélectrique des solvants, il faut privilégier l'utilisation de solvants avec une grande constante diélectrique.

Quelques exemples de constante diélectrique sont présentés dans le Tableau 27.

Solvant	Température d'ébullition (°C)	ϵ
Acétone	56	20,7
Dichlorométhane	40	8,9
Ether diéthylique	35	4,3
THF	66	7,6
Toluène	111	2,4
Trifluorotoluène	102	9,2
Tert-Butanol	83	12,4

Tableau 27 : Caractéristiques physiques de quelques solvants organiques (ϵ obtenues à 30°C)

¹⁷⁹ Kim K.K., Song H.K., hin D.H., Hwang K.Y., Suh S.W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*. **1997**, 5, 173-185.

¹⁸⁰ Torres S., Castro G.R. Non-Aqueous Biocatalysis in Homogeneous Solvent Systems. *Food Technology and Biotechnology*. **2004**, 42, 271-277.

¹⁸¹ Doukyu N., Ogino H. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*. **2010**, 48, 270-282.

Par exemple, le toluène qui est souvent un solvant de choix en catalyse enzymatique est bien trop apolaire pour une étude sous irradiation micro-onde ($\epsilon=2,4$). Le remplacement de ce solvant par son dérivé halogéné permet d'augmenter la valeur de la constante diélectrique et permettre ainsi une montée rapide en température des solvants.

En comparant le toluène à son dérivé halogéné, le trifluorotoluène, une constante diélectrique bien plus élevée est observée pour le trifluorotoluène (9,2), lui permettant de s'échauffer plus rapidement.

De plus, à notre connaissance, le trifluorotoluène n'a jamais été utilisé sur un système enzymatique. Il serait donc intéressant de découvrir le comportement de la lipase B de *Candida antarctica* en présence de ce solvant aprotique polaire.

La première étude concerne la résolution enzymatique du mandélate de méthyle par réaction d'amidification en présence de l'allylamine dans différents solvants (trifluorotoluène et *tert*-butanol).

Il est connu dans la littérature par des études réalisées précédemment que la sélectivité et l'activité enzymatique sont sensibles aux conditions de solvant et de température^{182,183}. L'étude de la sélectivité et de l'activité enzymatique sera donc étudiée dans ces deux solvants.

3. Etude de la résolution du mandélate de méthyle dans le trifluorotoluène

La résolution du mandélate de méthyle par amidification a tout d'abord été réalisée dans une gamme de température entre 30 et 100 °C, dans le trifluorotoluène sous irradiation micro-onde en système ouvert.

Parallèlement, nous avons envisagé d'utiliser la lipase B de *Candida antarctica* en conditions drastiques, car les résultats précédemment obtenus ont montré que:

- La lipase est active à des températures dépassant les 100°C.
- L'irradiation micro-onde semble limiter la forte dénaturation enzymatique.

¹⁸² He W., Jia C., Ma Y., Yang Y., Zhang X., Feng B., Yue L. Lipase-catalyzed synthesis of phytostanyl esters in non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 67, 60-65.

¹⁸³ Dąbkowska K., Szewczyk K. Influence of temperature on the activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase in the kinetic resolution of mandelic acid enantiomers. *Biochemical Engineering Journal*. **2009**, 46, 147-153.

Afin de mieux définir le comportement enzymatique à haute température et tenter d'obtenir une quantité d' α -hydroxyamide chiral (**6a**) dans un laps de temps très court, nous avons envisagé l'amidification du mandélate de méthyle sous haute température, entre 100°C et 140°C par une réaction flash de 10 minutes (Schéma 85).

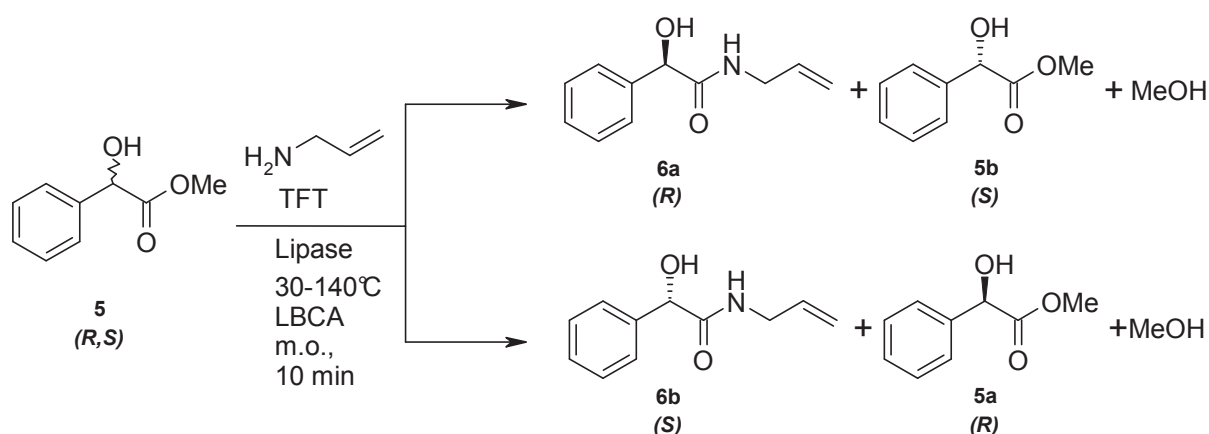


Schéma 85 : Amidification du mandélate de méthyle biocatalysée par la LBCA dans le TFT

La lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (Novozym 435) est utilisée avec une charge catalytique élevée (8g/L, 2000U). De fortes charges catalytiques sont très souvent observées lors de réaction d'amidification^{184,185}.

La réaction a tout d'abord été étudiée après une heure d'irradiation, avant que les propriétés de l'enzyme (conversion et sélectivité) ne soient déterminées par chromatographie en phase gazeuse.

Pour chaque condition testée, le taux conversion, l'excès et le ratio énantiomérique ont été calculés. (Tableau 28).

¹⁸⁴ Ragupathy L., Pluhar B., Ziener U., Keller H., Dyllick-Brenzinger R., Landfester K. Enzymatic aminolysis of lactones in aqueous miniemulsion: Catalysis through a novel pathway. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 62, 270-276.

¹⁸⁵ Pilissão C., De Oliveira Carvalho P., Da Graça Nascimento M. Enantioselective acylation of (*RS*)-phenylethylamine catalysed by lipases. *Process Biochemistry*. **2009**, 44, 1352-1357.

Entrée	Température (°C)	Mode de chauffage	c (%)	Ester ee _s (%)	Amide ee _p (%)	E
1	30	Système ouvert ^(a)	23	14	73	12
2	40	Système ouvert ^(a)	27	18	72	11
3	50	Système ouvert ^(a)	36	18	70	8,8
4	60	Système ouvert ^{(a)(c)}	44	24	45	5,5
5	70	Système ouvert ^(a)	62	20	40	3,4
6	80	Système ouvert ^(a)	52	23	33	2,5
7	90	Système ouvert ^(a)	39	20	32	1,6
8	100	Système ouvert ^(a)	36	17	30	1,5
9	100	Système fermé ^(b)	12	8	51	3,3
10	110	Système fermé ^(b)	15	8	42	2,6
11	120	Système fermé ^(b)	17	9	41	2,7
12	130	Système fermé ^(b)	18	9	40	2,5
13	140	Système fermé ^(b)	18	10	42	2,7

(a) Conditions : Mandélate de méthyle, 1.2 mmol dans 25 mL de trifluorotoluène, 200mg de LBCA, 60 min d'irradiation

(b) Conditions : Mandélate de méthyle, 0.12 mmol dans 2.5 mL de trifluorotoluène, 20mg de LBCA, 10 min d'irradiation

(c) Réaction purifiée par chromatographie sur colonne : Rdt : 55%, $[\alpha]_D = +50.1^\circ$ (c=1.04 CHCl₃) pour le mandélate de méthyle et $[\alpha]_D = -9.6^\circ$ (c=1.04 CHCl₃) pour le *N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide.

Tableau 28 : Conversion et sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* dans le trifluorotoluène entre 30°C et 140°C

Pour toutes les conditions testées, le (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) est retrouvé majoritairement. L'énantiopréférence de la lipase B de *Candida antarctica* est similaire sous irradiation micro-onde que ce soit en système ouvert ou fermé. Ni la température, ni l'irradiation ne modifient la sélectivité de l'enzyme.

- Etude de la réaction entre 30 et 100°C

Entre 30°C et 100°C la résolution du mandélate de méthyle a été réalisée par irradiation micro-onde en système ouvert.

Dans cette gamme de température, on observe des taux de conversion entre 23% (entrée 1) et 62% (entrée 5). Le taux de conversion maximal est obtenu à 70°C. L'obtention d'une si grande quantité de produit en seulement une heure d'irradiation montre clairement une parfaite activité de la lipase de *Candida antarctica* dans cette réaction modèle. L'irradiation micro-onde permet une conversion exceptionnelle du mandélate de méthyle par la LBCA.

Pour des températures plus élevées, des taux de conversion supérieures à 50% sont obtenues, signifiant que les deux énantiomères du mandélate de méthyle ont été consommés par la lipase, entraînant une faible sélectivité.

Les meilleurs excès énantiomériques de (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) sont obtenus pour des températures les plus basses. Les excès énantiomériques d'amides sont satisfaisants (supérieurs à 70%) entre 30 et 50 °C (entrées 1 à 3). Cependant, à partir de 60 °C, ces excès chutent drastiquement pour atteindre entre 30 et 45% (entre 60°C et 100°C).

Cette baisse de sélectivité par augmentation de la température est couramment observée dans la littérature^{186,187}. Elle serait due à une dénaturation thermique enzymatique résultant de la perte de la conformation de l'enzyme¹⁸⁸. Cette baisse de sélectivité pourrait aussi s'expliquer par une plus grande mobilité au niveau de la poche stéréospécifique de l'enzyme, permettant de façon plus aisée la pénétration du substrat de configuration (*S*) ou encore par une modification de l'entropie de la réaction. Ce dernier facteur est cependant très délicat à mesurer expérimentalement.

- Etude de la réaction entre 100 et 140°C

A plus haute température, entre 100°C et 140°C, l'utilisation d'un four micro-onde en système fermé est nécessaire pour s'affranchir du point d'ébullition du trifluorotoluène (102°C).

¹⁸⁶ Ong A.L., Kamaruddin A.H., Bhatia S., Long W.S., Lim S.T., Kumari R. Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (*R*)-ketoprofen. *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, 39, 924-929.

¹⁸⁷ Dong H.P., Wang Y.J., Zheng Y.G. Enantioselective hydrolysis of diethyl 3-hydroxyglutarate to ethyl (*S*)-3-hydroxyglutarate by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 66, 90-94.

¹⁸⁸ Kim J., Haam S., Park D.W., Ahn I.S., Lee T., Kim H.S., Kim W.S. Biocatalytic esterification of β -methylglucoside for synthesis of biocompatible sugar-containing vinyl esters. *Chemical Engineering Journal*. **2004**, 99, 15-22.

En système fermé, un fort taux de conversion est observé en seulement 10 minutes de réaction (12 à 18% de mandélate de méthyle sont consommés). Cette conversion est croissante avec la température, laissant présager d'une bonne stabilité enzymatique.

La sélectivité bien que modérée, avec des excès énantiomériques d'amide compris entre 42 et 51%, reste encourageante, et montre que même à des températures extrêmes pour la catalyse, la lipase est capable de permettre la conversion d'un substrat racémique. Les ratios énantiomériques, bien qu'ils soient faibles entre 2,7 et 3,3 restent stables entre 100 et 140°C.

Comparaison entre les deux modes de chauffage

En comparant la résolution à une même température (entrée 8 et 9, à 100°C) entre le chauffage en système ouvert et fermé, nous observons une différence importante du ratio énantiomérique, et donc du comportement enzymatique. Ce ratio d'une valeur de 3,3 en système fermé et de 1,5 en système ouvert peut s'expliquer de deux manières :

- La première est la différence de matériel utilisé, conduisant à des résultats sensiblement différents. Les différents types d'irradiation sous champs micro-onde ne sont pas comparables selon le four utilisé. Le CEM de chez Discover délivre une irradiation circulaire, alors que chez le Biotage Initiator, elle est linéaire.
- La seconde explication serait le changement d'échelle entre les deux modes de chauffage. En effet, bien que les concentrations soient identiques entre le chauffage en système ouvert et fermé, il existe un facteur 10 sur les quantités utilisées.

En conséquence, dans le trifluorotoluène, la lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme 435) est, comme on pouvait s'y attendre, sensible à la température. Une forte activité est observée dans le trifluorotoluène avec une conversion maximale de 62% à 70°C. La sélectivité est quant à elle satisfaisante dans les températures les plus faibles (30 à 50°C), avec un excès énantiomérique maximal d'amide de 73 % à 30°C.

Dans toutes les conditions étudiées, l'énantiopréférence de l'enzyme ne varie pas, la sélectivité pour la forme (*R*) du substrat est toujours observée (produit (**6a**)).

L'enzyme étant sensible à son micro-environnement, des réactions similaires ont été étudiées, cette fois dans le *tert*-butanol, alcool tertiaire protique polaire.

4. Etude de l'amidification du mandélate de méthyle dans le *tert*-butanol

Tout comme dans le trifluorotoluène, la résolution du mandélate de méthyle par amidification a été réalisée dans le *tert*-butanol, solvant protique polaire sous irradiation micro-onde entre 30 et 140°C en présence de la lipase B de *Candida antarctica* (Schéma 86).

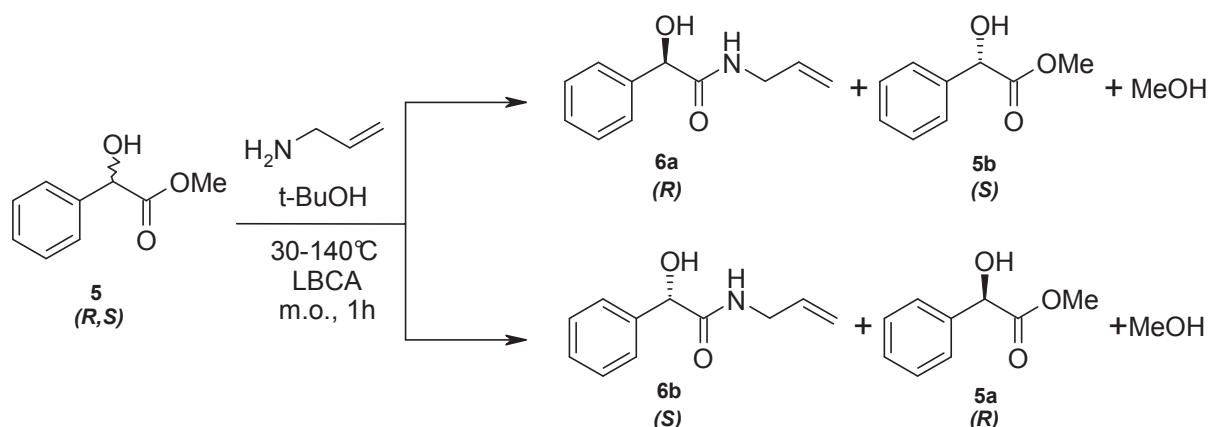


Schéma 86 : Résolution du mandélate de méthyle par amidification dans le *tert*-butanol

Le *tert*-butanol, alcool tertiaire polaire n'entre pas interaction avec le site actif de l'enzyme. Aucune réaction de transestérification du mandélate de méthyle par le *tert*-butanol ne sera possible¹⁸⁹.

Après une heure de réaction, la lipase est filtrée, et le brut analysé par chromatographie en phase gazeuse (Tableau 29).

¹⁸⁹ Villeneuve P. Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*. 2007, 25, 515-536.

Entrée	Température (°C)	Mode de chauffage	c (%)	Ester ee _s (%)	Amide ee _p (%)	E
1	30	Système ouvert ^(a)	18	20	85	14
2	40	Système ouvert ^(a)	18	19	87	17
3	50	Système ouvert ^(a)	32	29	62	5,8
4	60	Système ouvert ^(a)	28	25	64	3,1
5	70	Système ouvert ^(a)	35	28	52	4,1
6	80	Système ouvert ^{(a)(c)}	45	32	39	3,1
7	88	Système ouvert ^(a)	40	16	24	1,9
9	100	Système fermé ^(b)	1	1	26	1,8
10	110	Système fermé ^(b)	2	1	29	1,8
11	120	Système fermé ^(b)	3	2	31	1,9
12	130	Système fermé ^(b)	5	2	35	2,1
13	140	Système fermé ^(b)	9	3	25	1,7

(a) Conditions : Mandélate de méthyle, 1.2 mmol dans 25 mL de trifluorotoluène, 200mg de LBCA, 60 min d'irradiation

(b) Conditions : Mandélate de méthyle, 0.12 mmol dans 2.5 mL de trifluorotoluène, 20mg de LBCA, 10 min d'irradiation

(c) Réaction purifiée par chromatographie sur colonne : Rdt : 48%, $[\alpha]_D = +37.4^\circ$ (c=1.04 CHCl₃) pour le mandélate de méthyle et $[\alpha]_D = -5.4^\circ$ (c=1.04 CHCl₃) pour le (R)-N-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide.

Tableau 29 : Conversion et sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* dans le *tert*-butanol entre 30 et 140°C

- Etude de l'amidification entre 30°C et 88°C.

Dans la gamme de température entre 30 et 88°C, sous irradiation micro-onde en système ouvert, un taux de conversion satisfaisant entre 18% et 45 % est observé, avec une conversion optimale à 80°C.

Dans tous les cas, le (R)-N-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) est retrouvé.

En système ouvert entre 30 et 40 °C, des excès énantiomériques très satisfaisants sont observés avec un optimum de 87 % retrouvé à 40°C. Au-delà de ces températures, une perte drastique de sélectivité enzymatique est observée d'un facteur 7 entre 30°C et 88°C.

A 88°C, cette forte diminution pourrait être due à de nouvelles contraintes pour l'enzyme comme des mouvements de convection causés par le reflux du solvant, entraînant une perte de sélectivité.

- Etude de l'amidification entre 100 et 140°C

En augmentant la température au delà du point d'ébullition, par utilisation du chauffage sous irradiation micro-onde en système fermé entre 100 et 140 °C, une chute drastique du taux de conversion est observé, dès 100°C. Les rendements atteignent 9 % à 140°C, avec des excès énantiomériques de produit (**6a**) entre 25% (140°C) et 35% (130°C).

A haute température, le *tert*-butanol ne semble pas être un solvant protecteur pour la lipase. De faibles conversions sont obtenus quelles que soient les températures testées. Ce solvant semble induire une déstabilisation de l'enzyme par des facteurs physiques liés à sa forte vaporisation à haute températures. Ces températures peuvent entraîner de fortes pressions locales. Des facteurs physico-chimiques peuvent également provoquer une déstabilisation de l'enzyme en créant de nouvelles liaisons hydrogènes.

5. Comparaison des taux de conversion et de la sélectivité enzymatique dans le trifluorotoluène et le *tert*-butanol

Au sein des deux solvants utilisés (trifluorotoluène et le *tert*-butanol) le comportement de l'enzyme vis-à-vis de l'irradiation micro-onde n'est pas le même. Ces deux solvants visent chacun l'augmentation de la conversion ou de la sélectivité enzymatique.

1. Effet du solvant sur la conversion du mandélate de méthyle

Par utilisation du *tert*-butanol ou du trifluorotoluène, le (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) est toujours obtenu avec des taux de conversion globaux très satisfaisants au départ du mandélate de méthyle racémique, en utilisant l'irradiation micro-onde en système ouvert.

La lipase B de *Candida antarctica* immobilisée ne se comporte cependant pas de la même manière vis-à-vis de ces deux solvants organiques (Figure 18).

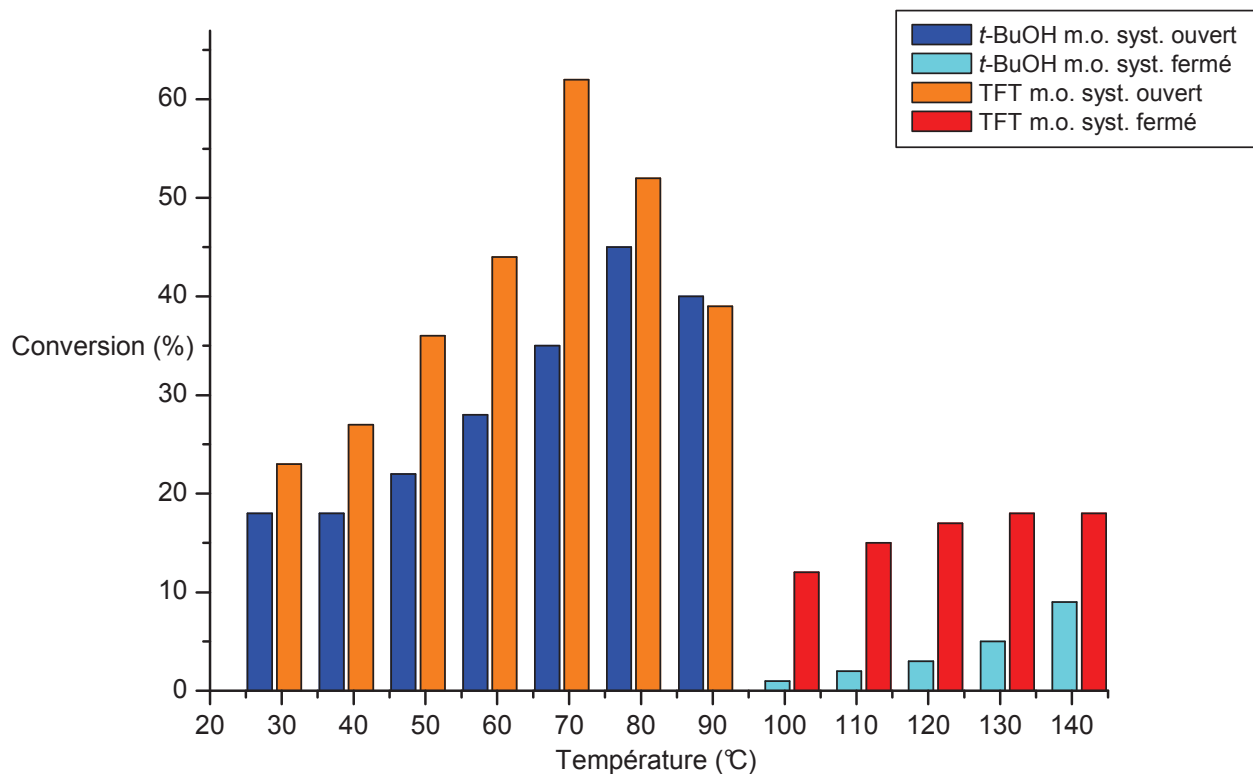


Figure 18 : Conversion du mandélate de méthyle racémique dans le tert-butanol et dans le trifluorotoluène en fonction de la température

Les taux de conversion enzymatiques les plus importants sont obtenus pour des températures situées entre 70 et 80°C. Au-delà, une dénaturation thermique des acides aminés essentiels à la catalyse enzymatique conduit à la désactivation partielle ou totale de la lipase.

La température optimale de catalyse enzymatique diffère de 10°C entre les deux solvants (70°C dans le trifluorotoluène, solvant aprotique polaire et 80°C dans le *tert*-butanol, solvant protique polaire).

Le trifluorotoluène est un solvant qui induit une activité enzymatique efficace, avec des rendements dépassant les 50 %, (taux de conversion =62 % à 70°C) aux dépens d'une sélectivité enzymatique, certes satisfaisante mais en deçà de celle du *tert*-butanol. Dans le *tert*-butanol, la conversion enzymatique est généralement un peu plus faible que dans le trifluorotoluène, mais avec une meilleure stabilité de l'enzyme.

Outre une différence de polarité et de structure entre les deux solvants organiques, les différences de conversions retrouvées seraient dues à la stabilisation de l'enzyme par le réseau de liaison hydrogène présent avec le *tert*-butanol mais absent dans le trifluorotoluène. Ce réseau permet une meilleure intégrité de l'enzyme en limitant sa mobilité. Le fait que le *tert*-butanol peut interagir fortement avec le substrat, toujours par liaison hydrogène, pourrait néanmoins limiter la disponibilité des substrats pour l'enzyme et donc les taux de conversion.

A plus forte température, que se soit en système ouvert et surtout en système fermé, ce réseau de liaison hydrogène relativement fragile est rompu, menant à une dégradation thermique irréversible.

2. Effet du solvant sur la sélectivité enzymatique

Les excès énantiomériques de l'amide (**6a**) de configuration (*R*) ont eux aussi été comparés dans le *tert*-butanol et le trifluorotoluène (Figure 19).

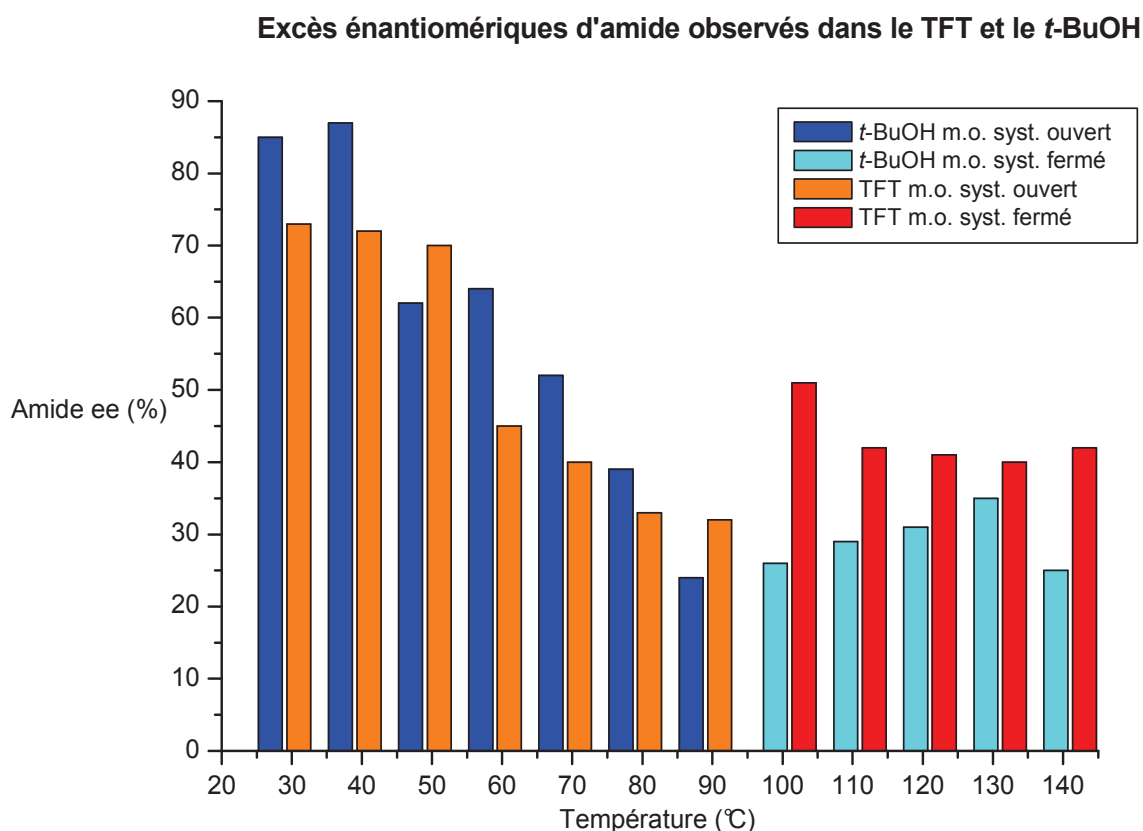


Figure 19 : Excès énantiomériques du *N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide dans le *tert*-butanol et dans le trifluorotoluène en fonction de la température

Une même tendance quant à l'évolution des excès énantiomériques d' α -hydroxyamide (**6a**) est observée pour le *tert*-butanol et le trifluorotoluène. Les meilleures sélectivités sont observées pour les températures les plus faibles entre 30°C et 40°C, avec de très bons excès énantiomériques d'amide (jusqu'à 87% dans le *tert*-butanol). Pour les températures les plus élevées, cette sélectivité chute de manière spectaculaire.

Cette chute de sélectivité vis-à-vis du mandélate de méthyle pourrait être la résultante d'une trop grande mobilité des acides aminés au niveau de la poche stéréospécifique de l'enzyme induisant la mauvaise discrimination des énantiomères.

Il ressort de cette étude que l'emploi du *tert*-butanol favoriserait une meilleure sélectivité enzymatique aux dépens de la conversion et que le trifluorotoluène favoriserait une meilleure conversion enzymatique au détriment de la sélectivité.

Possédant une meilleure compréhension du comportement de la lipase, nous avons essayé d'optimiser la quantité de (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) formé.

La prochaine étude vise à déterminer le temps idéal d'irradiation enzymatique pour la formation du produit attendu.

6. Résolution du mandélate de méthyle en fonction du temps de réaction

D'après les résultats obtenus, il s'avère que des excès énantiomériques satisfaisants avec un maximum de 87% peuvent être obtenus à 40°C. A cette température, un faible rendement de 18% est obtenu, cela ne permettant pas la synthèse à grande échelle de l' α -hydroxyamide (**6a**).

Le ratio énantiomérique de la lipase à 30°C et 40°C est supérieur à 10, ce qui nous laisse présager qu'il est possible d'obtenir le mandélate de méthyle ou l' α -hydroxyamide sous forme énantio pure.

En faisant varier la durée réactionnelle, on pourrait d'une part d'optimiser la catalyse enzymatique pour obtenir une plus grande quantité d'hydroxyamide, et d'autre part étudier le comportement de la lipase B de *Candida antarctica* sous irradiation micro-onde durant ce laps de temps.

1. Etude de la résolution du mandélate de méthyle dans le trifluorotoluène entre 1 et 6 heures

D'après les résultats précédents, nous avons montré que le trifluorotoluène est le solvant organique où les meilleurs taux de conversion enzymatiques sont obtenus. Afin d'optimiser ce taux de conversion en hydroxyamide (**6a**), la réaction a donc été prolongée dans le temps sur une durée variant entre 1 et 6 heures en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (Novozyme 435) (Schéma 87).

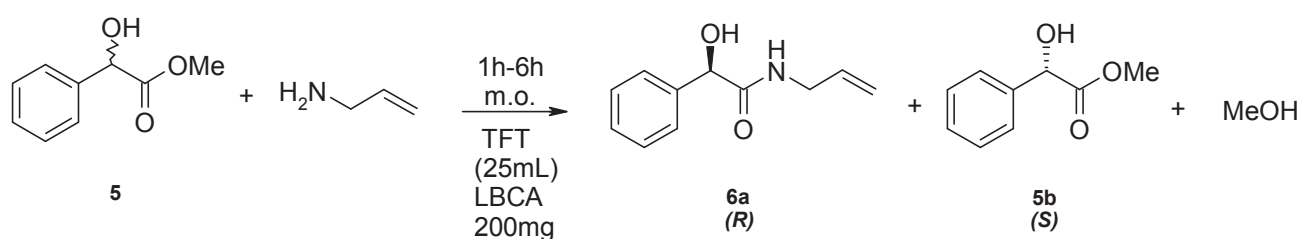


Schéma 87 : Résolution du mandélate de méthyle en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* entre 1 et 6 heures

Les taux de conversion ont tout d'abord été analysés entre 30 et 80°C, et indépendamment entre 1 et 6 heures d'irradiation (Figure 20).

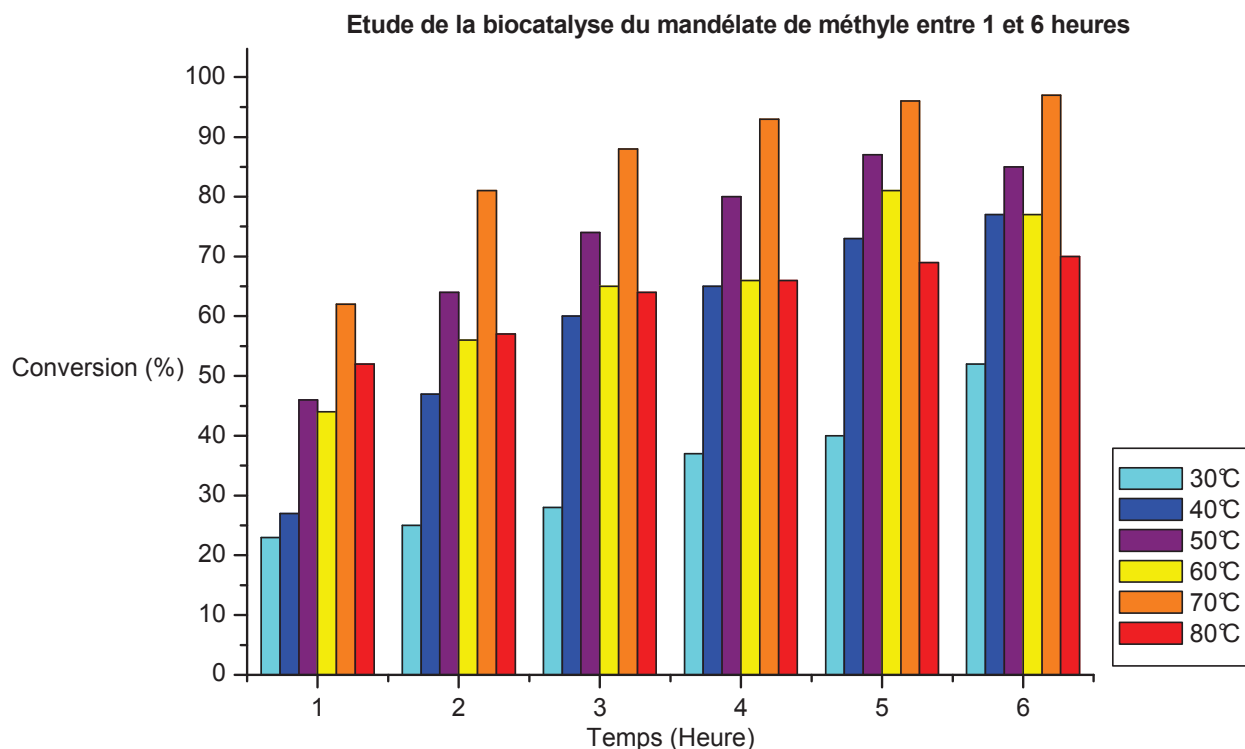


Figure 20 : Evolution du taux de conversion du mandélate de méthyle entre 30 et 80 °C entre 1 et 6 heures dans le trifluorotoluène

Ces résultats confirment que la température optimale de réaction est de 70°C où l'hydroxyamide est obtenu avec un rendement *quasi* quantitatif de 97%, en seulement 6 heures d'irradiation. Pour toutes les autres températures fixées, la réaction n'arrive pas à son terme pour deux raisons :

- Pour les températures en dessous de la température optimale, la réaction n'est pas terminée par manque d'énergie apportée au système enzymatique.
- Au delà de 70°C, une dénaturation thermique de l'enzyme ne permet plus sa catalyse efficace.

Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus de manière similaire au sein du *tert*-butanol comme solvant.

2. Etude de la résolution du mandélate de méthyle dans le *tert*-butanol entre 1 et 6 heures

Afin d'obtenir la meilleure catalyse possible pour l'obtention de l' α -hydroxyamide, il est nécessaire d'optimiser la conversion enzymatique mais surtout de conserver une sélectivité optimale.

D'après les précédents résultats, nous avons montré que le *tert*-butanol induit la meilleure sélectivité enzymatique. Si nous arrivons à conserver une bonne sélectivité tout en augmentant la conversion enzymatique, la conversion en α -hydroxyamide (**6a**) ou l' α -hydroxyester (**5b**) devrait être maximale.

Pour accroître la conversion enzymatique, la réaction a été prolongée dans le temps et la conversion enzymatique a été déterminée entre une et six heures (Schéma 88 et Figure 21).

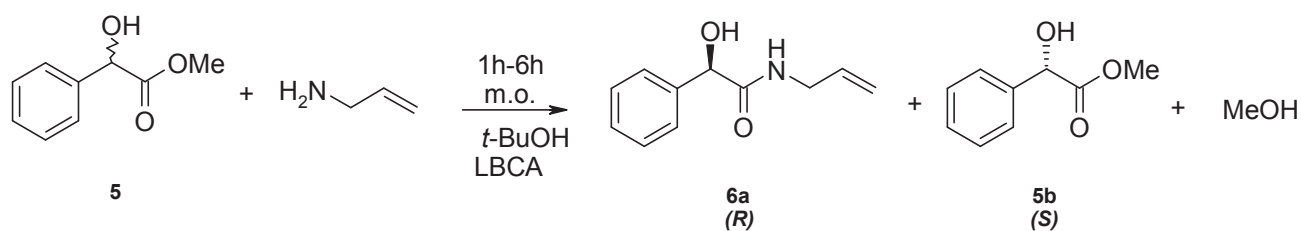


Schéma 88 : Résolution du mandélate de méthyle dans le *tert*-butanol entre 1 et 6 heures.

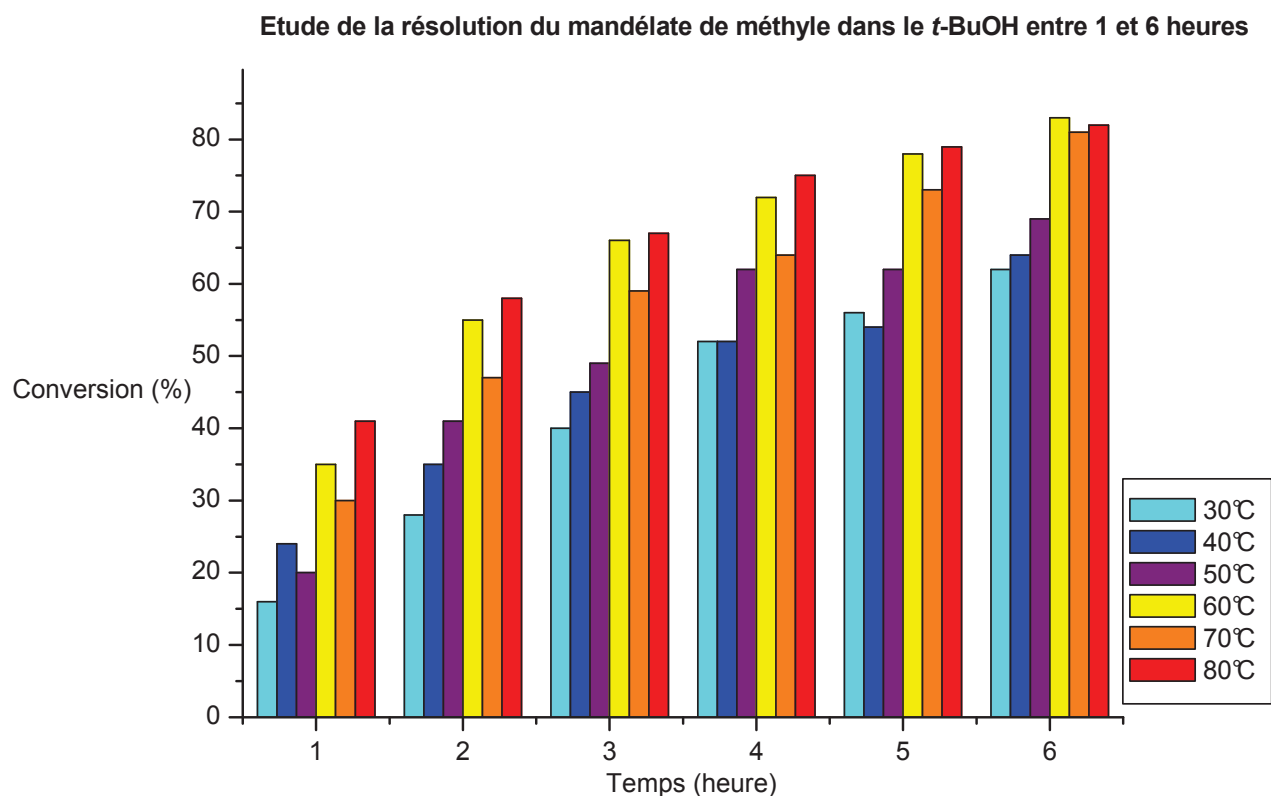


Figure 21 : Etude du taux de conversion enzymatique au cours du temps dans le *tert*-butanol

Comme dans le trifluorotoluène, les taux de conversion sont croissants avec la durée enzymatique, et une température entre 60 et 80°C permet la conversion de 85% de mandélate de méthyle. Cette conversion dépasse cependant les 60% à 30°C, nous laissant présager que les deux énantiomères du mandélate de méthyle ont été consommés par la lipase.

Ce résultat est confirmé en comparant les excès énantiométriques des produits obtenus (Figure 22)

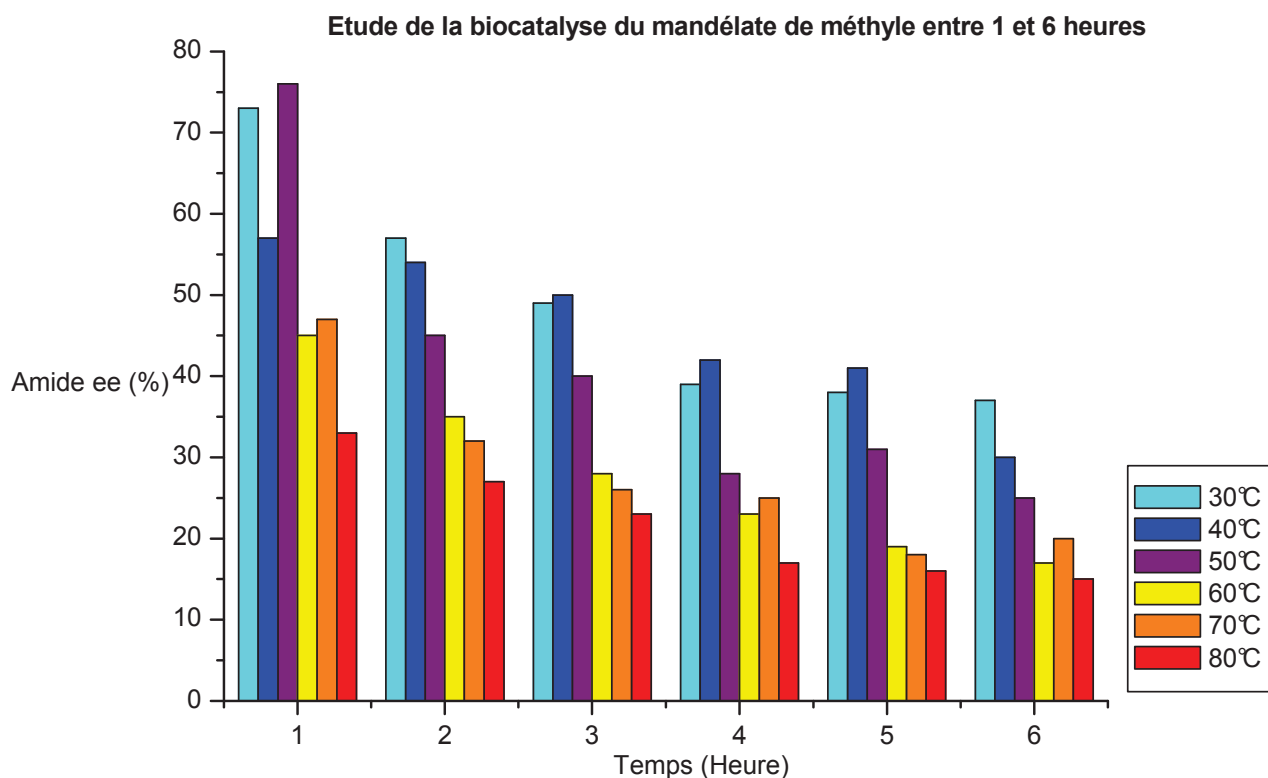


Figure 22 : Evolution du ratio énantiomérique entre 1 et 6 heures lors de la résolution du mandélate de méthyle par amidification

Les excès énantiomériques sont satisfaisants pour les temps réactionnels les plus faibles et les températures les plus basses, avec un optimum de la sélectivité ($ee_p = 87\%$) constaté à 30°C au bout d'une heure.

Cependant, dans toute la gamme de température, les excès énantiomériques de (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) chutent dès la première heure. Dans ces conditions, il n'est pas possible d'obtenir une résolution convenable du mandélate de méthyle quelle que la durée de la réaction.

Bien que l'excès énantiomérique de produit baisse au cours du temps, il est à noter que l'excès énantiomérique de substrat augmente pour atteindre les 61% (Figure 23).

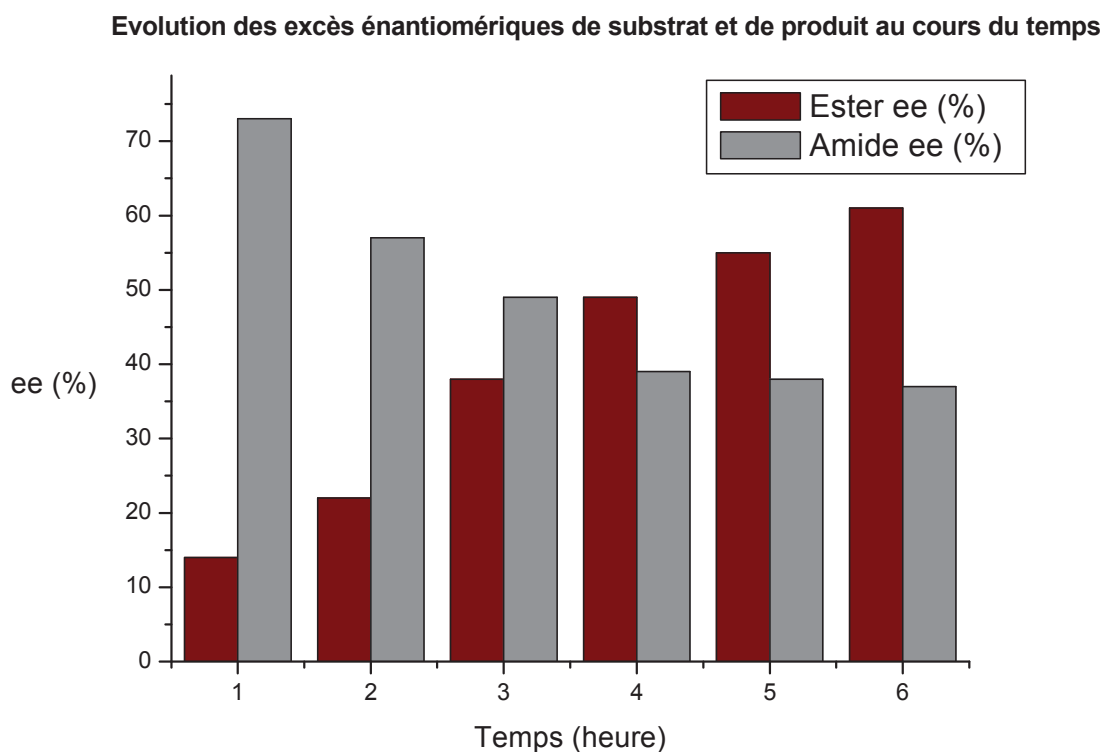


Figure 23 : Evolution des excès énantiomériques de substrat et de produit au cours du temps, à 30 °C

Une conversion *quasi*-totale du mandélate de méthyle par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée est observée dans le trifluorotoluène après 6 heures d'irradiation micro-onde en système ouvert. Ce temps est « extrêmement » court pour une catalyse enzymatique.

Par chauffage traditionnel, dans les mêmes conditions opératoires, α -hydroxyamide est obtenu avec un rendement de 12% après 8 heures. Indéniablement, la catalyse enzymatique est plus rapide sous irradiation micro-onde du fait de collisions moléculaires homogènes et d'une meilleure stabilité enzymatique.

Dans le *tert*-butanol, les taux de conversion enzymatiques sont satisfaisants mais nous constatons une diminution de la sélectivité au cours du temps.

La forte conversion enzymatique observée ainsi que la bonne sélectivité à basses températures sont très encourageantes pour l'optimisation de la résolution du mandélate de méthyle.

Parallèlement, nous avons décidé d'étudier l'influence de l'ordre d'ajout des réactifs sur la résolution enzymatique.

7. Etude de l'ordre d'introduction des substrats

D'un point de vue mécanistique, la lipase B de *Candida antarctica* obéit généralement à un mécanisme de type bi-bi ping-pong où le premier substrat qui pénètre dans le site actif de l'enzyme, est modifié et stabilisé par l'enzyme, puis le second substrat attaque l'acyl-enzyme formé.

Ces deux substrats sont susceptibles d'entrer en compétition l'un envers l'autre et de défavoriser la catalyse.

Afin de lever le doute sur le rôle de la pré-irradiation de la lipase en présence de l'un de ces substrats, deux protocoles différents ont été mis en œuvre.

Le premier protocole consiste à irradier le milieu réactionnel contenant le mandélate de méthyle en solution dans le *tert*-butanol, avec la lipase B de *Candida antarctica* pendant 15 minutes. L'allylamine solubilisée dans le *tert*-butanol est alors ajoutée, puis le mélange est de nouveau chauffé sous irradiation micro-onde pendant une heure avant analyse (**Méthode 1**).

Le second protocole repose sur la pré-irradiation de la lipase B de *Candida antarctica* en présence de l'allylamine solubilisée dans 20 mL de *tert*-butanol pendant 15 minutes, à différentes températures, avant l'ajout du mandélate de méthyle solubilisé dans le *tert*-butanol et l'irradiation du mélange pendant une heure (**Méthode 2**).

Après avoir pré-irradié la lipase en présence de l'un ou l'autre de ses substrats, les taux de conversion et sélectivités enzymatiques ont été déterminés et comparés avec une réaction témoin consistant en l'irradiation directe de la lipase avec ses substrats pendant une heure (Figure 24).

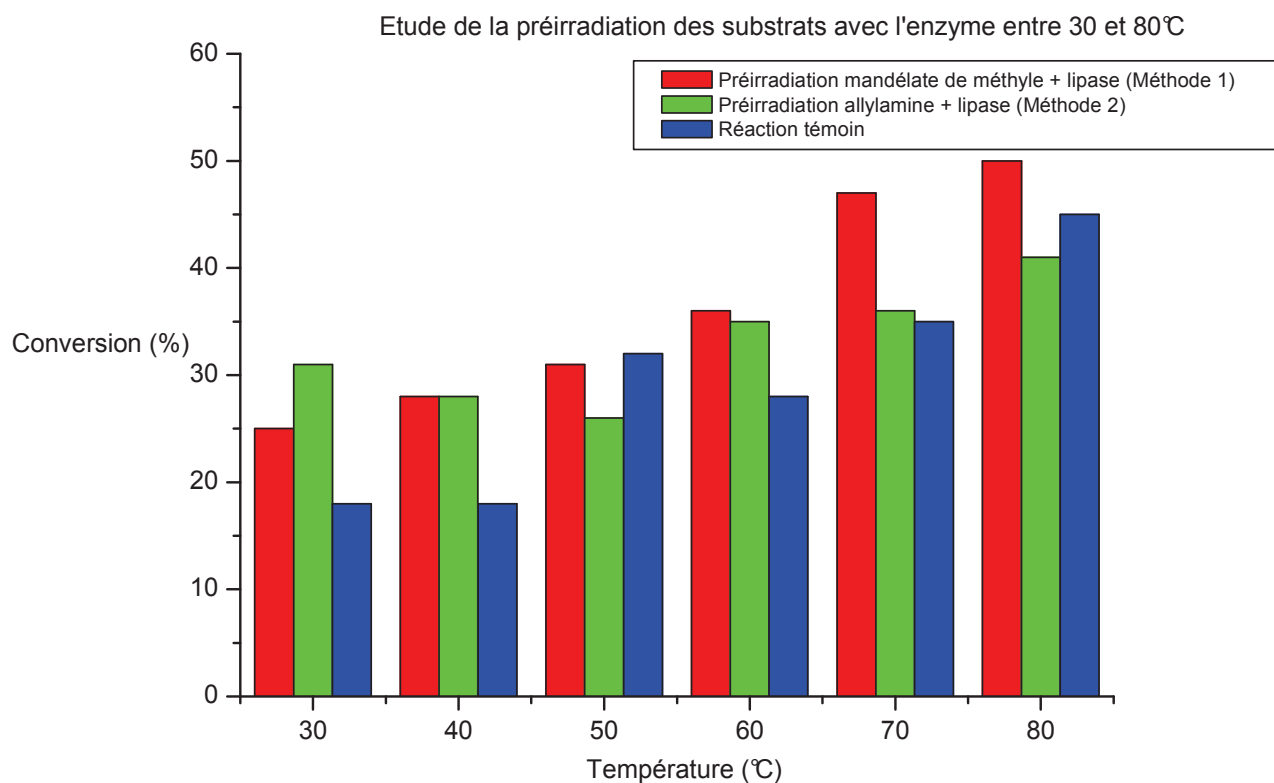


Figure 24 : Taux de conversion obtenus lors de la pré-irradiation de la lipase

Les taux de conversion de mandélate de méthyle sont différents selon la méthode employée.

Dans la majorité des cas, aux températures les plus basses, la pré-irradiation de la lipase avec un substrat semble favoriser la catalyse enzymatique comparée à celle obtenue par la réaction témoin. Ce résultat est le plus flagrant à 30 °C : si la lipase est pré-irradiée avec l'allylamine, la conversion est supérieure d'un facteur 1,9 comparée à la réaction témoin.

Pour toutes les températures testées, excepté à 30 °C, lorsque la lipase B de *Candida antarctica* est pré-irradiée en présence le mandélate de méthyle, les taux de conversion obtenus sont meilleures à celles obtenues après pré-irradiation de la lipase avec l'allylamine.

La pré-irradiation de la lipase avec le mandélate de méthyle semble plus favorable à la formation et à la stabilisation du premier complexe tétrahédrique ou de l'acyl-enzyme.

Les excès énantiomériques en produits ont également été calculés après réaction (Figure 25).

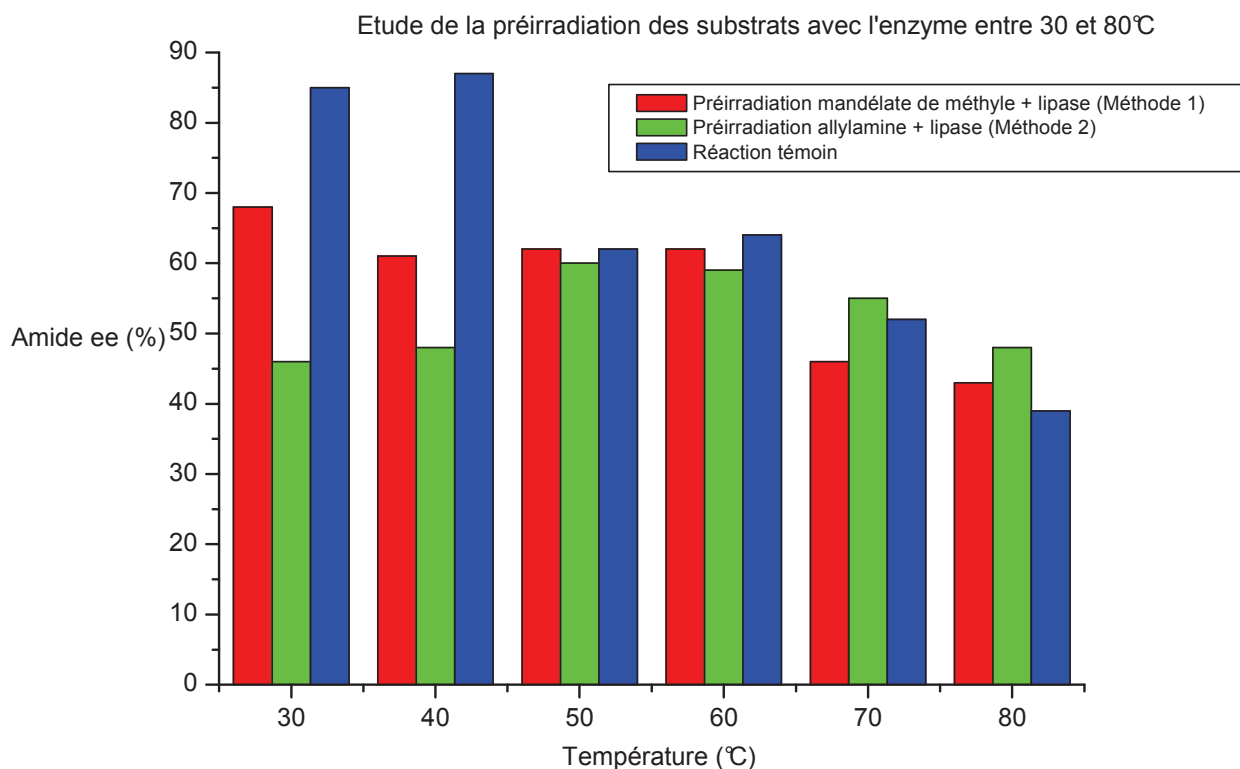


Figure 25 : Taux de conversion obtenus lors de la pré-irradiation de la lipase

A 30°C et 40°C, après pré-irradiation de l'enzyme avec le mandélate de méthyle ou l'allylamine, nous observons une sélectivité moindre que pour un système non pré-irradié. Une baisse de 25% d'excès énantiomérique est constatée pour les deux modes de pré-irradiation enzymatique par rapport à la réaction témoin.

Dès 50°C, des excès énantiomériques très similaires sont obtenus que ce soit avec ou sans pré-irradiation enzymatique.

La pré-irradiation de l'enzyme avec le mandélate de méthyle permet d'augmenter significativement la conversion enzymatique, sans pour autant limiter la sélectivité de l'enzyme.

8. Résolution du mandélate de méthyle par utilisation d'amines primaires encombrées

Ne pouvant résoudre efficacement le mandélate de méthyle en utilisant l'allylamine en tant que nucléophile, nous avons décidé d'opter pour un choix d'amines plus encombrées. En augmentant l'encombrement stérique des amines, nous pensons modifier le comportement de la lipase B de *Candida antarctica* et augmenter la sélectivité enzymatique.

1. Condensation de la benzylamine sur le mandélate de méthyle

Parmi les différentes amines primaires pouvant être condensées, nous avons choisi la benzylamine, qui, du fait de son relatif encombrement stérique pourrait mieux discriminer les deux énantiomères du mandélate de méthyle.

De plus, la benzylamine est structurellement proche de l'allylamine (Figure 26).

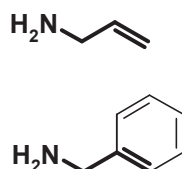


Figure 26 : Comparaison structurelle entre l'allylamine et la benzylamine

Il serait donc intéressant de découvrir le comportement de la lipase B de *Candida antarctica* vis-à-vis de cette amine primaire. Ainsi, deux équivalents de benzylamine ont été condensés en présence de la LBCA, à 40°C, sous irradiation micro-onde en système ouvert (CEM) pendant 1 heure, dans le trifluorotoluène (Schéma 89).

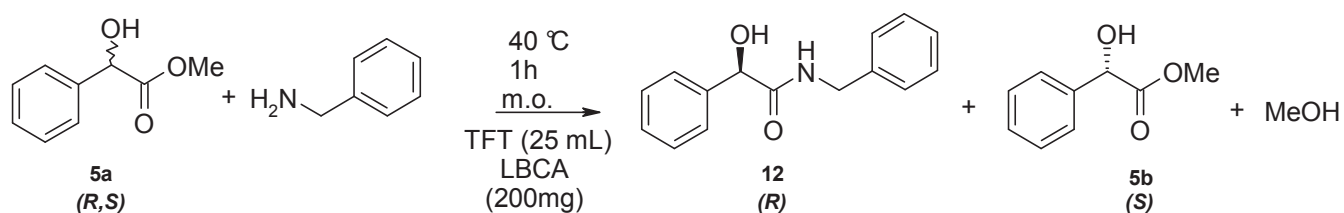


Schéma 89 : Résolution du mandélate de méthyle par amidification en présence de la lipase B de *Candida antarctica* sous irradiation micro-onde

Quelle que soit la durée d'irradiation micro-onde, la conversion en amide est très lente. Après 4 heures de réaction, le rendement est de 25% avec une sélectivité nulle.

L'augmentation de la température à 80°C conduit à l'obtention d'un meilleur rendement de 41% avec cependant, un très médiocre excès énantiomérique de 5%.

L'optimisation des paramètres expérimentaux ne nous a pas permis d'obtenir une résolution satisfaisante. Une probable cause peut être liée au trop fort encombrement stérique de la benzylamine comparé à l'allylamine, ou bien à de nouvelles interactions enzyme/benzylamine. Le π stacking, résultant de l'interaction du groupement phényle de la benzylamine et d'acides aminés phényles comme par exemple la phénylalanine ou le tryptophane pourrait être l'une de ces nouvelles interactions. Cette forte interaction conduirait à la non utilisation de la benzylamine comme substrat.

Pour distinguer le facteur encombrement stérique et interaction, l'aniline a été choisie comme amine primaire. Cette amine aromatique est moins « encombrée » que la benzylamine et peut également permettre des interactions de type π -stacking.

2. Condensation de dérivés anilines sur le mandélate de méthyle

L'amidification en présence d'aniline a été tentée en présence de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée, sous irradiation micro-onde et en chauffage conventionnel à 40°C (Schéma 90).

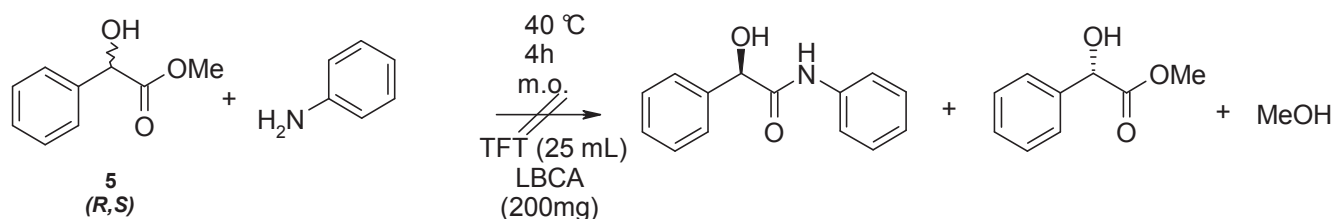


Schéma 90 : Tentatives d'obtention des hydroxyamides chiraux à partir de l'aniline

Cependant, malgré toutes les conditions opératoires mises en œuvre en faisant varier la température, la durée du temps d'irradiation ou encore la nature du solvant, aucune trace de produit n'a été détectée. Cette absence totale d'activité de l'enzyme pourrait être due à une plus faible nucléophilie de l'amine.

Pour accentuer son caractère nucléophile, des amines aromatiques substituées en *ortho* ou *para* (*o*-aniline, *p*-aniline, 2,4,6-triméthoxyaniline) par des groupements électrodonneurs de type méthoxy ont été utilisées (Schéma 90).

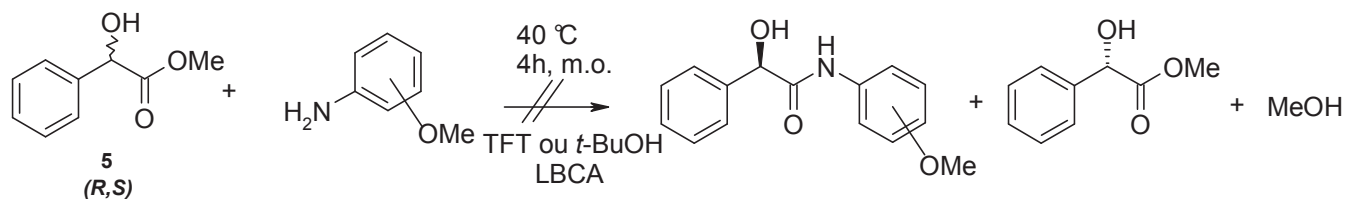


Schéma 91 : Tentative d'obtention des hydroxyamides à partir des dérivés anilines substitués

De nouveau, aucun amide n'est obtenu, que ce soit en chauffage sous irradiation micro-onde ou en chauffage classique.

L'utilisation d'amines primaires encombrées dans la synthèse d'hydroxyamides chiraux en présence de cet enzyme ne semble pas permettre une meilleure discrimination entre les deux énantiomères.

En conséquence, de meilleures stratégies de synthèses doivent être étudiées afin d'obtenir ces dérivés avec un contrôle de la sélectivité.

9. Conclusions sur la résolution du mandélate de méthyle par amidification

La résolution de mandélate de méthyle par amidification a tout d'abord été étudiée avec des lipases, immobilisées ou non, dans deux solvants organiques polaires : le trifluorotoluène et le *tert*-butanol, sous irradiation micro-onde en système ouvert ou fermé.

La lipase B de *Candida antarctica* nous est apparue comme étant le meilleur biocatalyseur pour cette résolution.

Différentes études ont montré que cette lipase est fortement active sous irradiation micro-onde, surtout dans le trifluorotoluène, pour les températures les plus élevées, avec des conversions totales dans un temps acceptable pour une catalyse enzymatique (6 heures à 70°C).

La sélectivité a elle aussi été étudiée. La lipase B de *Candida antarctica* est un enzyme capable de réaliser assez efficacement la déracémisation du mandélate de méthyle dans les températures les plus basses.

Les meilleurs taux de conversion ont donc été obtenus dans le trifluorotoluène à 70°C, alors que les meilleurs excès énantiomériques de produits sont obtenus dans le *tert*-butanol à 30°C.

Il n'a cependant pas été possible de coupler efficacement et de manière sélective des amines plus encombrées. Il nous faut donc, afin d'obtenir ces α -hydroxyamides complexes, étudier une nouvelle stratégie de déracémisation du mandélate de méthyle.

II. Résolution du mandélate de méthyle par acétylation énantiosélective

Afin de résoudre efficacement le mandélate de méthyle, nous avons étudié l'acétylation énantiosélective de la fonction hydroxyle du mandélate de méthyle (Schéma 92).

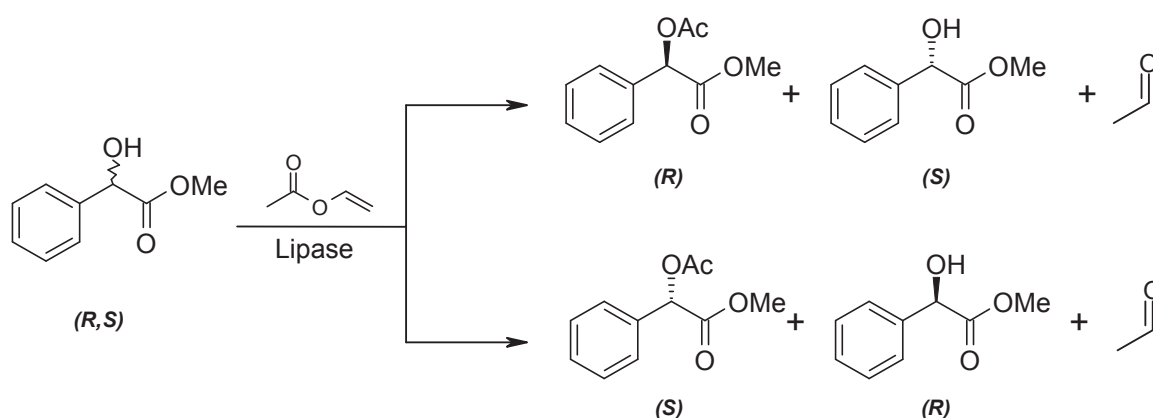


Schéma 92 : Stratégie de résolution du mandélate de méthyle biocatalysées par des lipases par acétylation énantiosélective

Lors de cette réaction le donneur d'acyle utilisé est l'acétate de vinyle. Le mandélate de méthyle nucléophile attaque le complexe acyl-enzyme. Par utilisation de donneurs d'acyles vinyliques, le produit libéré, l'énol vinylique est en équilibre tautomérique avec l'acétaldéhyde. L'acétaldéhyde formé, par sa faible tension de vapeur ne peut plus pénétrer dans le site actif de l'enzyme et forcera l'irréversibilité de la réaction.

Dans la littérature, cette réaction a été décrite par utilisation de la lipase de *Pseudomonas cepacia* dans l'éther diisopropylique pendant 96 heures à 35°C (Schéma 93)
190

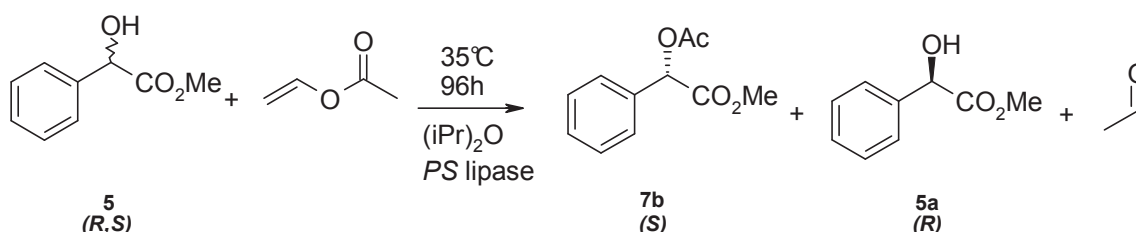


Schéma 93 : Acétylation sélective du mandélate de méthyle par utilisation de la lipase de *Pseudomonas cepacia* en chauffage conventionnel

Par analogie, nous nous sommes focalisé sur l'optimisation rapide de cette *O*-acétylation par chauffage sous irradiation micro-onde.

¹⁹⁰ Queiroz N., Graça Nascimento M. *Pseudomonas sp.* lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (*R,S*)-methyl mandelate. *Tetrahedron Letters*. **2002**, 43, 5225-5227.

1. Synthèse des (*R*) et (*S*)-*O*-acétyl mandélate de méthyle énantio-purs

Comme pour la réaction d'amidification, l'optimisation des conditions opératoires a été précédée de la synthèse des étalons énantio-purs (*R*)- et (*S*)-*O*-acétyl-mandélate de méthyle afin de valider la conversion et la sélectivité de la lipase.

1. Synthèse des *O*-acétyl-mandélate de méthyles (**7a**) et (**7b**) par voie chimique

La synthèse de chaque énantiomère estérifié a tout d'abord été réalisée par synthèse chimique classique en utilisant l'anhydride acétique dans la pyridine (Schéma 94). Après deux heures de réaction, chaque énantiomère est obtenu avec un rendement *quasi*-quantitatif.

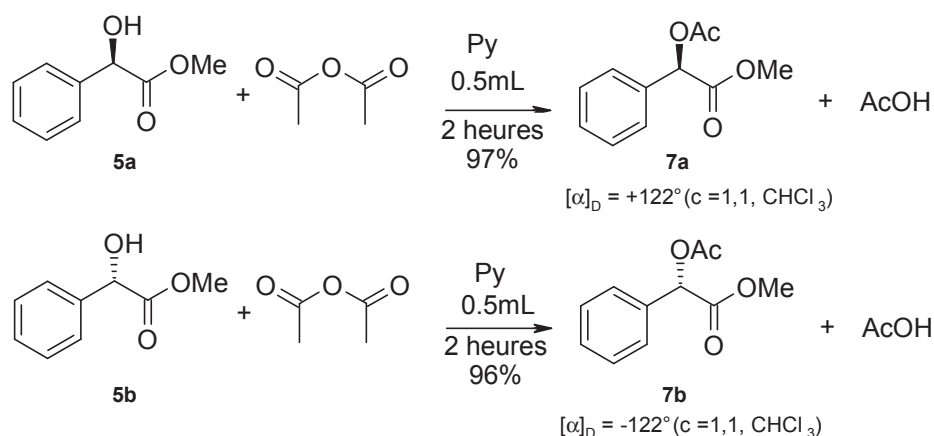
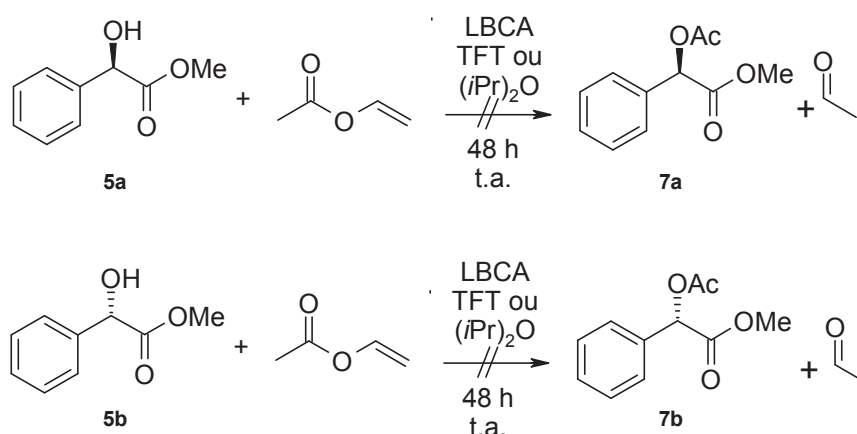


Schéma 94 : Synthèse chimique des deux énantiomères du *O*-acétyl-mandélate de méthyle

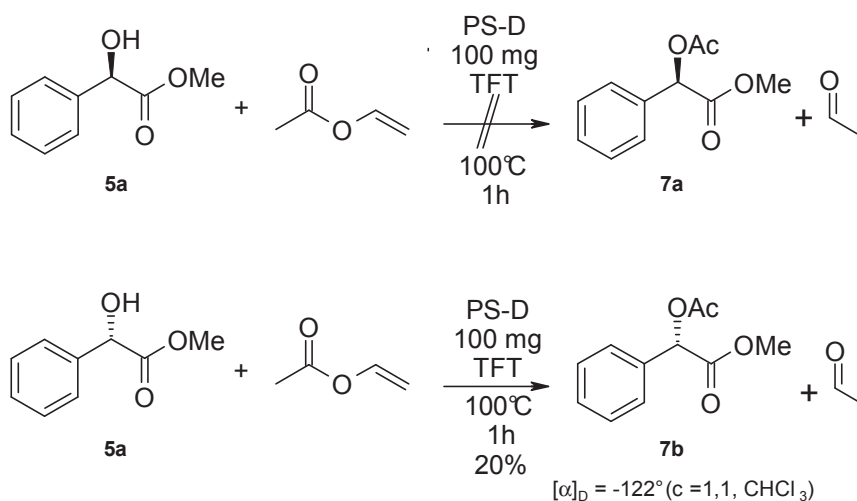
2. Synthèse des énantiomères par voie enzymatique

Poursuivant nos recherches sur l'acétylation en présence de la lipase B de *Candida antarctica immobilisée*, la synthèse enzymatique des deux énantiomères a été envisagée en utilisant cette lipase (Schéma 95). Après 48 heures à température ambiante, aucun produit n'est repéré, quel que soit l'énantiomère et le solvant utilisé.



La lipase B de *Candida antarctica* n'est donc pas une lipase appropriée pour l'estérification des α -hydroxyesters, contrairement à la réaction d'amidification.

La synthèse enzymatique de ces deux énantiomères a donc été réalisée en utilisant la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur diatomée (PS-D), comme cela était supposé dans la littérature. Une forte température de 100°C a été appliquée afin de montrer que cette lipase est bien aussi thermostable que la lipase B de *Candida antarctica*. Suite aux résultats précédents, nous avons décidé de mener la réaction enzymatique avec la lipase de *Pseudomonas cepacia* dans le trifluorotoluène (Schéma 96).



Il est intéressant de noter que seul le mandélate de méthyle de configuration (S) est acétylé par la lipase de *Pseudomonas cepacia* avec un modeste rendement de 20%. Le produit acétylé de configuration (R) a été uniquement repéré sous forme de traces par CPG.

Dans ce cas de figure, il s'avère que la lipase de *Pseudomonas cepacia* ne consomme qu'un seul des deux énantiomères, laissant présager une grande sélectivité de l'enzyme pour l'énantiomère de configuration (*S*).

Ayant obtenu les deux produits étalons par voie chimique ou enzymatique, l'acétylation du mandélate de méthyle par la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur diatomée a été optimisée sous irradiation micro-onde.

2. Acétylation du mandélate de méthyle par utilisation de la lipase de *Pseudomonas cepacia* sous irradiation micro-onde

L'acétylation du mandélate de méthyle a été tentée par chauffage sous champ micro-onde à 35°C, dans l'éther diisopropylique comme solvant. Bien qu'étant un solvant très apolaire, cet éther a été retenu comme solvant de choix pour deux raisons :

-D'après la littérature, c'est le meilleur solvant utilisé pour l'acétylation du mandélate de méthyle¹⁹⁷.

-La réaction est étudiée à une faible température de 35°C, une grande polarité du milieu n'est ici pas nécessaire pour échauffer le milieu.

L'acétylation du mandélate de méthyle a été conduite pendant 8 heures sous irradiation sous champs micro-onde en système ouvert à 35°C (Schéma 97).

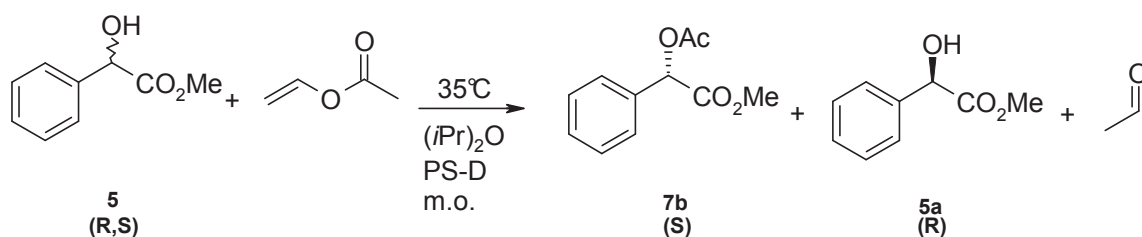


Schéma 97 : Résolution du mandélate de méthyle par la lipase de *Pseudomonas cepacia*.

Après seulement huit heures d'irradiation en système ouvert à 35°C, le mandélate de méthyle de configuration (*S*) est totalement consommé par la lipase de *Pseudomonas cepacia*, l'ester (**7b**) est obtenu avec un excellent excès énantiomérique de 97%, et une conversion de 50%. Le mandélate de méthyle (**5a**) restant est obtenu avec une sélectivité totale.

Après purification des molécules sur colonne de chromatographie, les valeurs des pouvoirs rotatoires déterminés sont conformes à ceux de la littérature (Tableau 30).

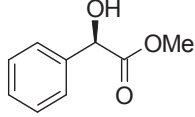
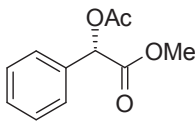
Molécule	$[\alpha]_D$ exp.	$[\alpha]_D$ litt.
 5a	-142°, (c=1.0 MeOH)	-142°(c=1.0, MeOH) ¹⁷⁸
 7b	+122°, (c=1,1 CHCl ₃)	+123°, (c=1.1 CHCl ₃) ¹⁹¹

Tableau 30 : Pouvoirs rotatoires obtenus pour les (*S*) et (*R*)-*O* acétyl-mandélate de méthyle

L'optimisation sous irradiation micro-onde permet la résolution du mandélate de méthyle après 8 heures d'irradiation. Par comparaison, après 5 jours par chauffage classique à l'aide d'un bain, dans les mêmes conditions, seulement 24% de conversion sont observés, avec néanmoins une aussi bonne sélectivité.

Les pouvoirs rotatoires, ainsi que les données spectroscopiques confirment l'excellente sélectivité de la lipase de *Pseudomonas cepacia* pour le mandélate de méthyle de configuration (*S*).

Etant donné la grande sélectivité de la réaction, nous avons essayé de diminuer encore les temps de réactions enzymatiques, par l'étude de temps de pré-irradiation optimal et par utilisation de réactions flashes à haute température.

1. Etude du temps de pré-irradiation optimal

L'influence de la pré-irradiation d'un enzyme en présence de l'un de ses substrats à déjà été montrée pour la lipase B de *Candida antarctica*¹²⁵. Afin de confirmer cette tendance nous avons entrepris une étude de la pré-irradiation de *Pseudomonas cepacia*.

¹⁹¹ Toshiyuki I., Yuichi M., Yoshikazu A., Shi-Hui H., Shohei W., Shuichi H., Motoi K., Higeomi T., Minoru M., Yoshihiko H. Increased Enantioselectivity and Remarkable Acceleration of Lipase-Catalyzed Transesterification by Using an Imidazolium PEG-Alkyl Sulfate Ionic Liquid. *Chemistry : A European Journal*. **2006**, 12, 9228-9237.

La lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur diatomée a été pré-irradiée en présence du mandélate de méthyle pendant une durée de 10 à 25 minutes. L'acétate de vinyle a alors été ajouté à l'aide d'une ampoule à additionner sous irradiation continue à une température imposée de 35°C (Tableau 24). Le brut réactionnel a été irradié pendant une heure (Schéma 98 et Tableau 31).

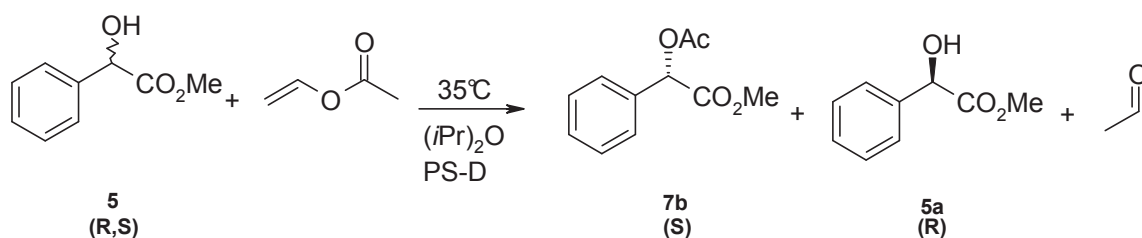


Schéma 98 : Résolution du mandélate de méthyle par la lipase de *Pseudomonas cepacia*

Temps d'irradiation (min)	c (%)	Monoester ee _s (%)	Diester ee _p (%)	E
10	26	36	96	69
15	31	43	97	100
20	30	41	95	58
25	27	34	94	45

Tableau 31 : Pré-irradiation enzymatique entre 10 et 25 minutes en présence du mandélate de méthyle avant l'ajout de l'acétate de vinyle

Suivant la durée de pré-irradiation enzymatique, nous observons une différence significative entre les excès énantiomériques de produit (*S*)-*O*-acétylé (**7b**) et celui du mandélate de méthyle (**5a**). Les excès énantiomériques en produit acétylé varient entre 94% et 97% et ceux du mandélate de méthyle entre 34% et 43%. Cette différence est remarquée plus aisément en comparant les ratios énantiomériques qui varient d'un facteur 2,2 entre une pré-irradiation de 25 minutes ou de 15 minutes.

Il semble nécessaire d'irradier la lipase en présence du mandélate de méthyle pendant une durée optimale de 15 minutes. Il est à noter que lors de la pré-irradiation de la lipase en

présence de l'acétate de vinyle, aucune différence significative de conversion ou de sélectivité n'est observée.

Une deuxième solution consisterait à augmenter la température au sein du milieu. Lors de la synthèse des étalons énantipurs par voie enzymatique, une bonne thermostabilité de la lipase de *Pseudomonas cepacia* a été observée à 100°C. Il serait donc intéressant d'étudier le comportement de l'enzyme à cette température en présence d'un racémique.

2. Acétylation énantiosélective à haute température

Afin de définir le temps de réaction idéal, l'acétylation du mandélate de méthyle à 100°C en présence de lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur diatomée a été conduite entre 1 et 8 heures sous irradiation micro-onde en système fermé (Schéma 99).

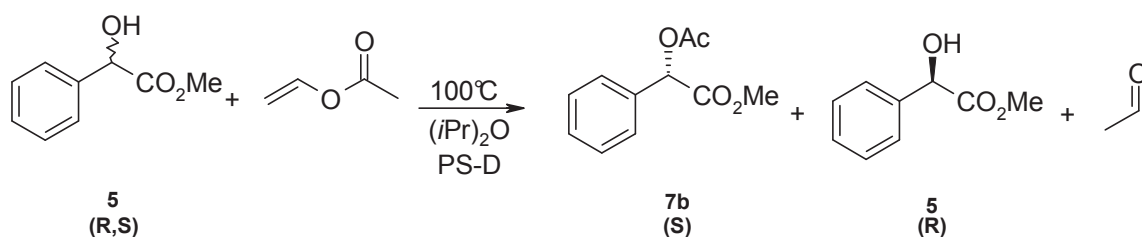


Schéma 99 : Résolution du mandélate de méthyle par acétylation de l'alcool secondaire sous irradiation micro-onde.

La réaction a été suivie au cours du temps (Tableau 32).

Temps (h)	c (%)	ee _s monoester (%)	ee _p diester (%)	E
1	15	12	98	111
4	27	42	93	41
8	36	53	90	32

Tableau 32 : Suivi de l'acétylation énantiosélective à 100°C en système fermé au cours du temps

Bien que l'acétylation soit parfaitement sélective en tout début de réaction avec un excellent excès énantiomérique de produit de 98%, nous pouvons constater une importante

chute de la sélectivité enzymatique au cours du temps (E = 32 à 8 heures), laissant présager d'une dénaturation thermique de l'enzyme.

Possédant le mandélate de méthyle énantipur (**5a**), nous avons décidé de réaliser des couplages chimiques classiques d'amines primaires pour l'obtention des α -hydroxyamides chiraux.

III. Application de l'utilisation d' α -hydroxyester chiral à la synthèse de molécules d'intérêts

La *O*-acétylation sous irradiation micro-onde en système ouvert à 35 °C en présence *Pseudomonas cepacia* immobilisée permet un contrôle total de la résolution du mandélate de méthyle (Schéma 100).

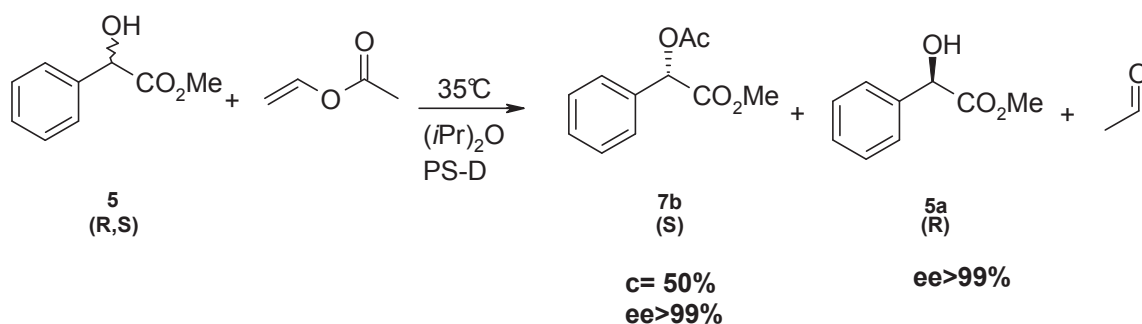


Schéma 100 : Résolution du mandélate de méthyle par acétylation de l'alcool secondaire sous irradiation micro-onde.

Le (*R*) mandélate de méthyle (**5a**) ainsi obtenu a été saponifié puis couplé à différentes amines primaires afin d'obtenir de nouveaux α -hydroxyamides chiraux (Schéma 101).

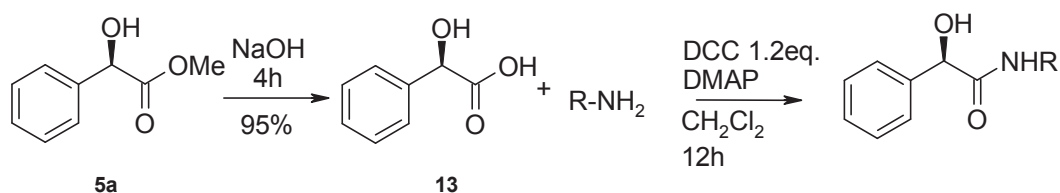


Schéma 101 : Saponification du mandélate de méthyle énantipure et couplage chimique avec des amines primaires

Après saponification dans un mélange aqueux de soude, l'acide mandélique (**13**) de configuration (*R*) est récupéré puis couplé, en présence d'agents de couplage DCC/DMAP à des amines primaires allyliques ou aromatiques. Les rendements ainsi que les valeurs des pouvoirs rotatoires des α -hydroxyamides chiraux sont rassemblés dans le Tableau 33.

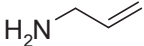
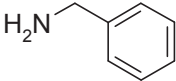
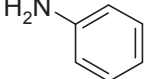
R-NH ₂	Composé	Rdt. (%)	[α] _D exp.	[α] _D litt.
	6a	84	-71° (c = 1,0, CHCl ₃)	-70,4 (c = 1,0 CHCl ₃) ¹⁸²
	12	79	-81° (c = 1,0 CHCl ₃)	-82,4° (c = 1,0 CHCl ₃) ¹⁹²
	14	74	-82° (c = 1,0 ChCl ₃)	-

Tableau 33 : Condensation d'amines primaires sur l'acide mandélique

Les puretés optiques des amides obtenus à partir de l'allylamine et de la benzylamine, sont conformes celles retrouvées dans la littérature.

Conclusions sur la résolution du mandélate de méthyle sous irradiation micro-onde

La résolution enzymatique assistée sous irradiation micro-onde du mandélate de méthyle en présence de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* sous forme libre ou immobilisée a été réalisée par amidification ou estérification (Schéma 102).

¹⁹² Chen C.T., Bettigeri S., Weng S.S., Pawar V., Lin Y.H., Liu C.Y., Lee W.Z. Asymmetric Aerobic Oxidation of α -Hydroxy Acid Derivatives by C4-Symmetric, Vanadate-Centered, Tetrakisvanadyl(V) Clusters Derived from N-Salicylidene- α -aminocarboxylates. *Journal of Organic Chemistry*. **2007**, 72, 8175-8185.

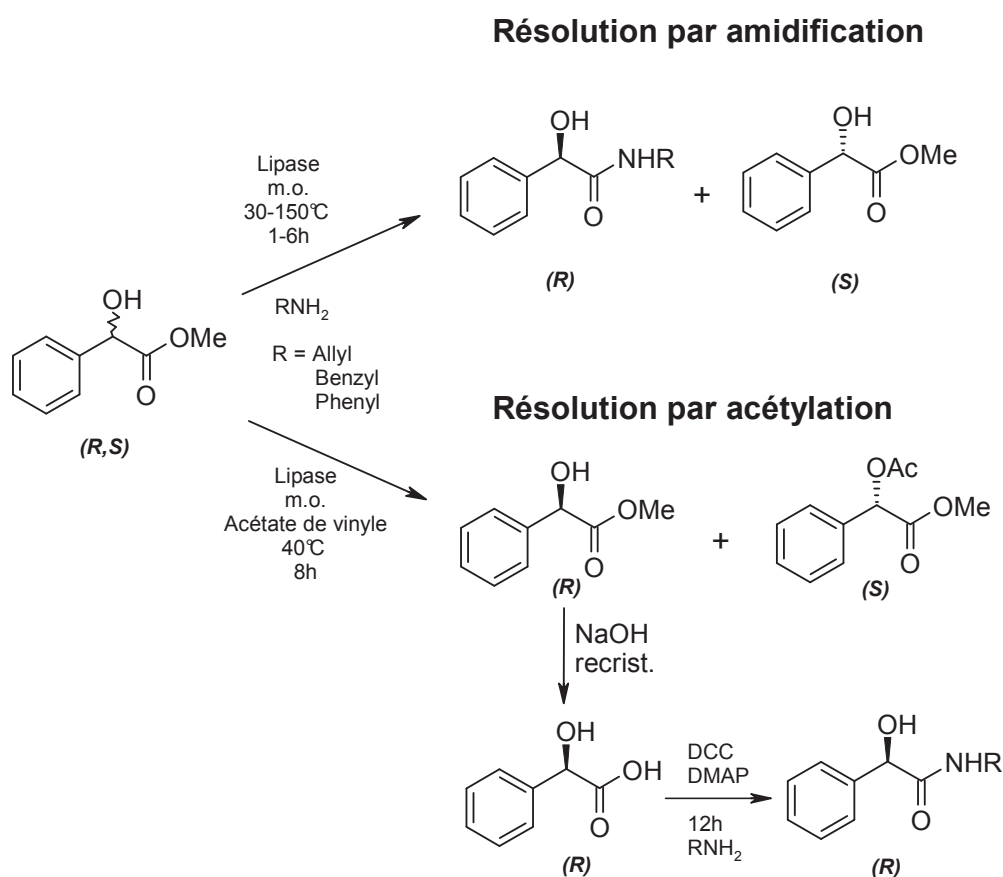


Schéma 102 : Résolution du mandélate de méthyle par amidification et estérification en présence de lipases

Nous avons constaté que les biocatalyseurs étudiés ne possèdent pas le même comportement suivant la réaction étudiée.

La résolution énantiosélective par amidification avec la lipase de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (Novozyme 435) conduit à la synthèse du (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) avec un modeste rendement de 18% mais une sélectivité satisfaisante de 85%. Aucune autre lipase testée n'a permis d'obtenir un tel résultat. La lipase B de *Candida antarctica* permet une résolution relativement efficace du mandélate de méthyle pour de faibles températures (70°C) et de basses puissances d'irradiation. Néanmoins, il semble que l'enzyme conserve une certaine activité catalytique à des températures plus élevées et pour une puissance d'irradiation plus importante.

Cependant, l'utilisation de lipase B de *Candida antarctica* ne nous a pas permis de réaliser efficacement la résolution énantiosélective du mandélate de méthyle par acétylation.

La résolution est satisfaisante en utilisant lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur diatomée. Le (*S*)-O acétyl mandélate de méthyle (**7b**) a ainsi été obtenu après 8 heures sous irradiation micro-onde en système ouvert à 35°C.

Suivant les réactions d'amidification ou d'acétylation énantiosélectives du mandélate de méthyle, il est possible de contrôler la chiralité du mandélate de méthyle de façon partielle. Par amidification, le (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) est ainsi obtenu avec un rendement très modeste de 18% mais avec un excès énantiomérique de 87%.

L'acétylation du mandélate de méthyle par la lipase de *Pseudomonas cepacia* conduit au mandélate de méthyle sous forme énantiopure de configuration (*R*). La saponification suivie d'une amidification en présence d'amines primaires nous a permis d'obtenir les composés de type (*R*)- α -hydroxyamides chiraux avec des rendements globaux de l'ordre 35%.

Pour obtenir le mandélate de méthyle de configuration (*S*), deux choix s'offrent à nous :

- Soit par optimisation de l'amidification sous champ micro-onde avec consommation totale du (*R*)-mandélate de méthyle (**5a**).

-Soit par saponification, en conditions douces du (*S*)-O-acétyl-mandélate de méthyle (**7b**).

Après ces études « théoriques » sur des réactions qualifiées de modèles, nous avons tenté d'appliquer les réactions de catalyse enzymatique assistées par micro-onde, à la résolution d'alcools secondaires chiraux de type polyols.

PARTIE EXPERIMENTALE

Résolution des alcools secondaires

Résolution des alcools secondaires linéaires sous irradiation micro-onde (METHODE H)

Dans un ballon de 10mL, 1 mmol d'alcool secondaire (**3,8** ou **9**) solubilisé dans 1 mL de trifluorotoluène, 10 mmol de propanoate de vinyle (1,09 mL), 10 mg de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (Novozyme 435, 100U) sont mis sous irradiation micro-onde en système ouvert (CEM Discover) à une température imposée (35°C à 95°C) pendant 10 minutes. Les puissances d'irradiation observées pour le maintien de la température sont données dans le tableau 34 suivant.

Température fixée (°C)	Puissances observées (W)		
	Butan-2-ol	Pentan-2-ol	Hexan-2-ol
35	2	2	2
45	5	5	6
55	8	9	11
65	12	12	13
75	14	13	16
95	16	16	18

Tableau 34 : Puissances d'irradiation observées selon la température fixée

Le brut réactionnel est filtré sur verre fritté, 0,2mL de brut réactionnel est prélevé pour analyse CPG. L'excédant de propanoate de vinyle est évaporé sous pression réduite. Une chromatographie sur gel de silice (EP/EOAC : 95/5) permet de séparer les esters (**4**), (**10**) ou (**11**) des alcools secondaires restants (**3**), (**8**) et (**9**).

Résolution des alcools secondaires linéaires en réacteur solide/gaz (METHODE I)

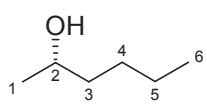
Le réacteur est constitué d'une colonne de 4 mm de diamètre interne, 6 mm de diamètre externe et 6 cm de long dans lequel la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur chromosorb P est empaquetée entre deux couches de laines de verre.

Un débit de gaz circulant (azote) est mis à buller dans les fioles de saturation contenant les substrats (alcools secondaires **3,8** ou **9**); avec un débit contrôlé total de 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. Les activités thermodynamiques du donneur d'acyle et des alcools secondaires ont été fixées à 0.1 et 0.05 respectivement. Les réactions enzymatiques ont été réalisées à 45 °C, en condition de vitesse initiale (quantité de produit formé négligeable); et les excès et ratio énantiomériques sont directement déterminées par chromatographie en phase gazeuse, couplée au réacteur solide/gaz.

Résolution des alcools secondaires linéaires en présence d'un liquide ionique sous irradiation micro-onde (METHODE J)

Dans un ballon de 10mL, 1 mmol d'alcool secondaire (**3,8** ou **9**) solubilisé dans 1 mL de liquide ionique ([BMIM][BF₄] ou [BMIM][PF₆]); 10 mmol de propanoate de vinyle (1,09 mL); 10 mg de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (Novozyme 435, 100U) sont mis sous irradiation micro-onde en système ouvert (CEM Discover) à une température fixée de 45°C (3-5 W) pendant 10 minutes. Le brut réactionnel est filtré. 0,2mL est prélevé pour analyse CPG. Le brut réactionnel est extrait au toluène (5x5 ml). Les phases organiques sont séchées sur sulfate de magnésium et évaporées.

(S)-Hexan-2-ol (3)

	$C_6H_{14}O$ MM = 102,1045 g.mol ⁻¹ Huile incolore
---	---

Le produit est obtenu suivant la méthode **H, I** ou **J**.

Les rendements et excès énantiomériques sont regroupés dans le tableau suivant :

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
H	45	96	3
I	45	-	3
J	45	98	2

$[\alpha]_D$: +12,2° (c = 1,0 EtOH)

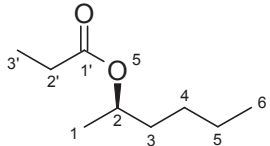
Conditions CPG: Température de la colonne durant l'analyse pendant 80 min : 90°C

ν (cm⁻¹) : 3348, 2963, 2932, 2862, 1458, 1373, 1327, 1146, 1111, 1053, 1018, 941, 841.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 3,74-3,80 (m, 1H, **H2**); 1,16-1,45 (m, 6H, **H3**, **H4** et **H5**); 1,18 (d, 3H, *J*=7,6 Hz, **H1**) ; 0,91 (t, 3H, *J*=7,6 Hz, **H6**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 67,7 (**C2**) ; 39,2 (**C3**) ; 27,8 (**C4**) ; 23,1 (**C5**) ; 22,5 (**C1**) ; 13,9 (**C6**).

(R)-Propionate de sec hexyle (4)

	$C_9H_{18}O_2$ MM = 158,2426 g.mol ⁻¹ Huile incolore
---	---

Le produit est obtenu par la méthode **H**, **I** ou **J**.

Les rendements et excès énantiomériques sont regroupés dans le tableau suivant :

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
H	95	5,5	99,9
I	45	-	99,9
J	45	7	>99,9

$[\alpha]_D$: -35,1° (c = 1,0 EtOH)

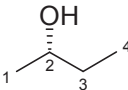
Conditions CPG: Température de la colonne durant l'analyse pendant 80 min : 90°C

ν (cm⁻¹) 2950, 2935, 1720, 1110.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 4,84-4,88 (m, 1H, , **H2**); 2,25 (q, 2H, $J=8,0$ Hz, **H2'**); 1,2-1,5 (m, 6H, **H3**, **H4** et **H5**); 1,16 (d, 3H, $J=8,0$ Hz, **H1**); 1,09 (t, 3H, $J=8,0$ Hz, **H3'**); 0,85 (t, 3H, $J=6.9$ Hz, **H6**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 170,7 (**C1'**) ; 35,6 (**C2**) ; 27,0 (**C2'** ou **C3**); 27,5 (**C2'** ou **C3**) ; 22,4 (**C4**) ; 19,9 (**C5**); 13,9 (**C4'**) ; 5,1 (**C6**).

(S)-Butan-2-ol (8)

	$C_4H_{10}O$ MM = 74.1237 g.mol ⁻¹ Huile incolore
---	--

Le produit est obtenu suivant la méthode **H**, **I** ou **J**.

Les rendements et excès énantiomériques sont regroupés dans le tableau suivant :

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
H	45	93	6
I	45	-	6
J	45	92	5

Conditions CPG: Température de la colonne durant l'analyse pendant 80min : 85°C.

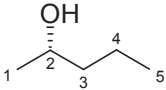
$[\alpha]_D$: +13,2° (c = 1,0 CH₃CN)

ν (cm⁻¹) : 2234, 2965, 2878, 1457, 1105, 990.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 3,53-3,59 (m, 1H, **H2**) ; 1,35-1,45 (m, 2H, **H3**) ; 1,05-1,20 (m, 3H, **H1**) ; 0.89 (t, *J*=6.3 Hz, 3H, **H4**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 70,0 (**C2**) ; 33,0 (**C3**) ; 23,3 (**C1**) ; 9,9 (**C4**).

(S)-Pentan-2-ol (9)

	$C_5H_{12}O$ MM = 88.1508 g.mol ⁻¹ Huile incolore
---	--

Le produit est obtenu suivant la méthode **H**, **I** ou **J**.

Les rendements et excès énantiomériques sont regroupés dans le tableau suivant :

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
H	45	95	4
I	45	-	5
J	45	94	5

Conditions CPG: Température de la colonne durant l'analyse pendant 80 min : 90°C

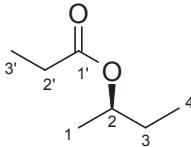
$[\alpha]_D$: +13,0° (c = 1,0 EtOH)

ν (cm⁻¹) : 3337, 2930, 2873, 1458, 1372, 948.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 3,69-3,82 (m, 1H, **H2**); 1,28-1,50 (m, 4H, **H3** et **H4**); 1,09-1,12 (m, 3H, **H1**); 0,90 (t, 3H, *J*=8,0 Hz, **H5**)

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 67,8 (**C2**) ; 41,6 (**C3**) ; 23,4 (**C4**) ; 19,0 (**C1**) ; 14,1 (**C6**).

(R)-Propanoate de sec-butyle (10)

	$C_7H_{14}O_2$ MM = 130.1984 g.mol ⁻¹ Huile incolore
---	---

Le produit est obtenu par la méthode **H, I** ou **J**

Méthode	Température	Rdt (%)	ee (%)
H	95	9	61
I	45	-	61
J	45	8	68

Conditions CPG: Température de la colonne durant l'analyse pendant 80min : 85°C.

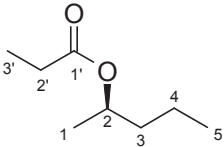
[α]_D : -19,2° (c = 1,0 EtOH)

ν (cm⁻¹) : 2974, 2941, 2881, 1732, 1032.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 4,08-4,12 (m, 1H, **H2**); 2,27-2,3 (m, 2H, **H2'**); 1,53-1,59 (m, 2H, **H3**); 1,27-1,32 (m, 3H, **H1**), 1,08-1,10 (m, 3H, **H3'**); 0,92 (t, 3H, $J=8,0$ Hz, **H4**)

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 170,0 (**C1'**) ; 72,1 (**C2**) ; 29,7 (**C3**) ; 26,5 (**C2'**) ; 21,0 (**C1**) ; 9,9 (**C4** ou **C3'**) ; 9,7 (**C4** ou **C3'**).

(R)-Propanoate de *sec*-pentyle (11)

	$C_8H_{16}O_2$ MM = 144,2155 g.mol ⁻¹ Huile incolore
---	---

Le produit est obtenu par la méthode **H**, **I** ou **J**.

Les rendements et excès énantiomériques sont regroupés dans le tableau suivant :

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
H	95	8	98
I	45	-	98
J	45	7	98

$[\alpha]_D$: -33,0° (c = 1,0 EtOH)

Conditions CPG: Température de la colonne durant l'analyse pendant 80 min : 90°C

ν (cm⁻¹) : 2961, 2937, 1733, 1129.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 4,02-4,11 (m, 1H, **H2**); 2,22 (q, 2H, $J=8,0$ Hz, **H3**); 1,48-1,52 (m, 2H, **H2'**); 1,32-1,37 (m, 5H, **H1** et **H5**); 0,98-1,10 (m, 3H, **H3'**); 0,91 (t, 3H, $J=8,0$ Hz, **H5**)

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 173,0 (**C1'**); 72,2 (**C2**); 39,3 (**C3**); 28,2 (**C2'**); 20,6 (**C1**); 19,1 (**C4**); 14,3 (**C5**); 10,0 (**C3'**)

Résolution du mandélate de méthyle

Résolution du mandélate de méthyle par amidification en système ouvert sous irradiation micro-onde (METHODE K)

Dans un ballon de 100mL, 1,2 mmol, de mandélate de méthyle racémique (**5**) (200 mg) et 2,4 mmol d'allylamine (0,19mL) sont solubilisés dans 25mL de solvant (trifluorotoluène ou tert-butanol). Après l'ajout de 200mg de lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme 435, 2000U), le mélange est chauffé sous irradiation micro-onde en système ouvert (CEM Discover) à une température fixe (30-100°C pour le TFT et 30-88°C pour le tert-butanol) pendant 1 à 6 heures.

Les puissances d'irradiation observées selon la température fixée sont données dans le tableau suivant :

Température fixée (°C)	Puissances observées (W)	
	Trifluorotoluène	Tert-butanol
30	2	1
40	2	2
50	3	2
60	3	2
70	6	2
80	6	2
88	6	4
90	6	-
100	12	-

Après filtration du brut réactionnel sur verre fritté et prélèvement de 0.2mL pour analyse CPG, le solvant est évaporé sous vide. Une chromatographie sur gel de silice (DCM 100%) permet d'isoler le (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) et le mandélate de méthyle énantioenrichi (**5b**).

Résolution du mandélate de méthyle sous irradiation micro-onde en système fermé (METHODE L)

Dans un réacteur, 0,12 mmol de mandélate de méthyle racémique (**5**) (20mg) et 0,24 mmol d'allylamine (0,19 mL) sont solubilisés dans 2,5 mL de solvant (trifluorotoluène ou tert-butanol). Après l'ajout de 20 mg de lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (200 U); le milieu est chauffé sous irradiation micro-onde en système fermé, à température fixe (entre 100 et 140°C) pendant 10 minutes.

Les irradiations et les pressions observées pour chaque température fixée sont données dans le tableau suivant :

Température (°C)	Trifluorotoluène		<i>Tert</i> -butanol	
	Puissance (W)	Pression (bar)	Puissance (W)	Pression (bar)
100	28	0	22	0
110	35	0	31	1
120	39	1	35	1
130	41	1	39	2
140	42	2	44	2

Le brut réactionnel est ensuite filtré sur verre fritté et 0,2 mL de filtrat est prélevé pour analyse CPG. Une chromatographie sur gel de silice (DCM 100%) permet d'isoler le (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) et le mandélate de méthyle énantioenrichi (**5b**).

Etude de l'ordre d'introduction des substrats lors de l'amidification du mandélate de méthyle (METHODE M)

- Par pré-irradiation de la lipase avec le mandélate de méthyle

Sous atmosphère inerte, le mandélate de méthyle (**5**) (1.2 mmol, 200 mg) solubilisé dans 20 mL de *tert*-butanol est pré-irradié sous irradiation micro-onde en système ouvert (CEM Discover) pendant 15 minutes en présence de la lipase B de *Candida antarctica*, immobilisée sur résine acrylique (200mg, 2000U). L'allylamine (2.4 mmol, 0.19mL) solubilisée dans 5 mL de *tert*-butanol est ajoutée à l'aide d'une ampoule à additionner et le mélange est irradié pendant 1 heure à température imposée, entre 30 °C et 80 °C (2-6 W). La lipase est ensuite immédiatement filtrée et 0,2 mL de filtrat est prélevé pour analyse CPG. Une chromatographie sur gel de silice (DCM 100%) permet d'isoler le (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) et le mandélate de méthyle énantioenrichi (**5b**).

- Par pré-irradiation de la lipase avec l'allylamine.

Sous atmosphère inerte, l'allylamine (1.2 mmol, 200 mg) solubilisée dans 20 mL de *tert*-butanol est pré-irradiée sous irradiation micro-onde en système ouvert (CEM Discover) pendant 15 minutes en présence de la lipase B de *Candida antarctica*, immobilisée sur résine acrylique (200mg, 2000U). Le mandélate de méthyle (1,2 mmol, 200mg) solubilisé dans 5 mL de *tert*-butanol est ajouté au biais d'une ampoule à additionner et le mélange est irradié pendant 1 heure à température fixée, entre 30 °C et 80 °C (2-6W). La lipase est ensuite immédiatement filtrée et 0,2 mL de filtrat est prélevé pour analyse CPG. Une chromatographie sur gel de silice (DCM 100%) permet d'isoler le (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) et le mandélate de méthyle énantioenrichi (**5b**).

Résolution du mandélate de méthyle par utilisation d'amines primaires encombrées (METHODE N)

Dans un ballon de 100mL, 1,2 mmol, de mandélate de méthyle racémique (**5**) (200 mg) et 2.4 mmol d'amine primaire (benzylamine, aniline, *p*-méthoxyaniline ou 2,4,6-triméthoxyaniline) sont solubilisés dans 25mL de trifluorotoluène. Après l'ajout de 200mg de lipase B de *Candida antarctica* (Novozyme 435, 2000U) le mélange est chauffé sous irradiation micro-onde en système ouvert à 60°C (5-12 W) ou à 100°C (30-35 W) en système fermé pendant 1 à 4 heures. Après filtration du brut réactionnel sur verre fritté et prélèvement de 0.2mL de brut pour analyse CPG, le solvant est évaporé. Une chromatographie sur gel de silice (DCM 100%) permet d'isoler le produit (**12**) et le mandélate de méthyle restant (**5**).

Etude de l'acétylation du mandélate de méthyle sous irradiation micro-onde par utilisation de lipase en système ouvert (METHODE O)

Dans un ballon de 100 mL, à une solution de 1,2 mmol de mandélate de méthyle commercial (200mg) et 12 mmol d'acétate de vinyle (1,1 mL) solubilisés dans 25mL d'éther diisopropylique est ajoutée la lipase B de *Candida antarctica* ou lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur diatomée, 50U. Le mélange est chauffé sous irradiation micro-onde en système ouvert (CEM Discover) à une température fixée de 35°C (5 W) entre 1 et 8 heures. La lipase est ensuite filtrée, le brut réactionnel est évaporé. 0,2 mL de filtrat est prélevé pour analyse CPG et une chromatographie sur colonne (100% DCM) permet d'obtenir à l'état pur le (*S*)-*O*-acétyl-mandélate de méthyle (**7b**) et le mandélate de méthyle énantioenrichi (**5a**).

Etude de l'acétylation du mandélate de méthyle sous irradiation micro-onde par utilisation de la lipase de *Pseudomonas cepacia* en système fermé (METHODE P)

Dans un réacteur, à une solution de 0,12 mmol de mandélate de méthyle commercial (20mg) et 1,2 mmol d'acétate de vinyle (0,11 mL) solubilisés dans 2,5mL de l'éther diisopropylique est ajoutée la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur diatomée, 100mg, 50U. Le mélange est chauffé sous irradiation micro-onde en système fermé (Biotage Initiator eight) à une température fixée de 100°C (33W) pendant une durée de 1 à 8 heures. La

lipase est ensuite filtrée, le brut réactionnel est évaporé. 0,2 mL de brut réactionnel est prélevé pour l'analyse CPG. La chromatographie sur colonne (100% DCM) permet d'obtenir à l'état pur le (*S*)-*O*-acétylmandélate de méthyle (**7b**) et le mandélate de méthyle énantioenrichi (**5a**).

Etude du temps de pré-irradiation optimal pour la résolution du mandélate de méthyle par acétylation (METHODE Q)

Dans un bicol de 100 mL, le mandélate de méthyle (**7**) (1,2 mmol, 200mg) solubilisé dans 25 mL d'ether diisopropylique, est pré-irradié à 35°C (12 W) en présence de 100mg de lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur diatomée pendant une durée comprise entre 10 et 25 minutes. L'acétate de vinyle (12 mmol, 1,1mL) est alors ajouté par une ampoule à additionner et le mélange est irradié à une température fixée de 35°C pendant une heure. Le brut réactionnel est ensuite filtré sur verre fritté, 0,2 mL de filtrat est prélevé pour analyse CPG, et le solvant est évaporé sous pression réduite. Une chromatographie sur colonne (100% DCM) permet d'isoler le (*S*)-*O*-acétyl-mandélate de méthyle (**7b**) du mandélate de méthyle restant (**5a**).

(*R*)-Mandélate de méthyle (**5a**)

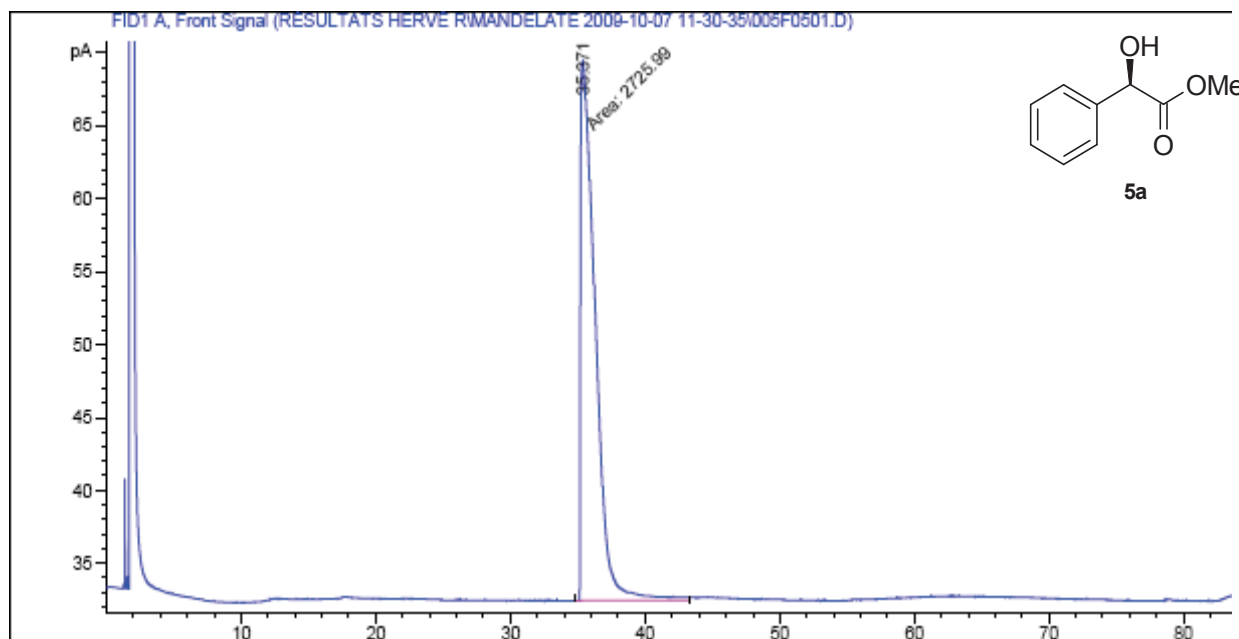
	$C_9H_{10}O_3$ MM = 166,1782 g.mol ⁻¹ Poudre blanche Pf. : 56°C
---	---

Obtenu par les méthodes **O**, **P**, ou **Q**.

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
O	35	50	99,9
P	100	36	53
Q	35	74	36

Conditions CPG : Montée de 80°C à 110° à 2°C/min (20 minutes) puis montée de 110°C à 180°C à 2°C/min. tr: 35.3 min

[α]_D : -142° (c = 1,0 CHCl₃)



Chromatogramme du (*R*)-mandélate de méthyle

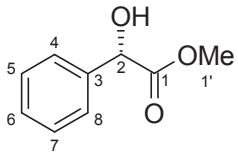
ν (cm⁻¹) : 3437, 2955, 1739, 1208, 737.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm): 7,32-7,45 (m, 5H, H_{arom}); 5,18 (s, 1H, H₂); 3,77 (s, 3H, H₁'); 3,45(s, 1H, OH).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 174,1 (C₁) ; 138,2 (C₃) ; 128,6 (C_{arom}) ; 128,5 (C_{arom}) ; 126,6 (C_{arom}) ; 72,9(C₂) ; 53,0 (C₁'').

SMHR calculée pour C₉H₁₀O₃Na : 189.05276, trouvé : 189.0525.

(S)-Mandélate de méthyle (5b)

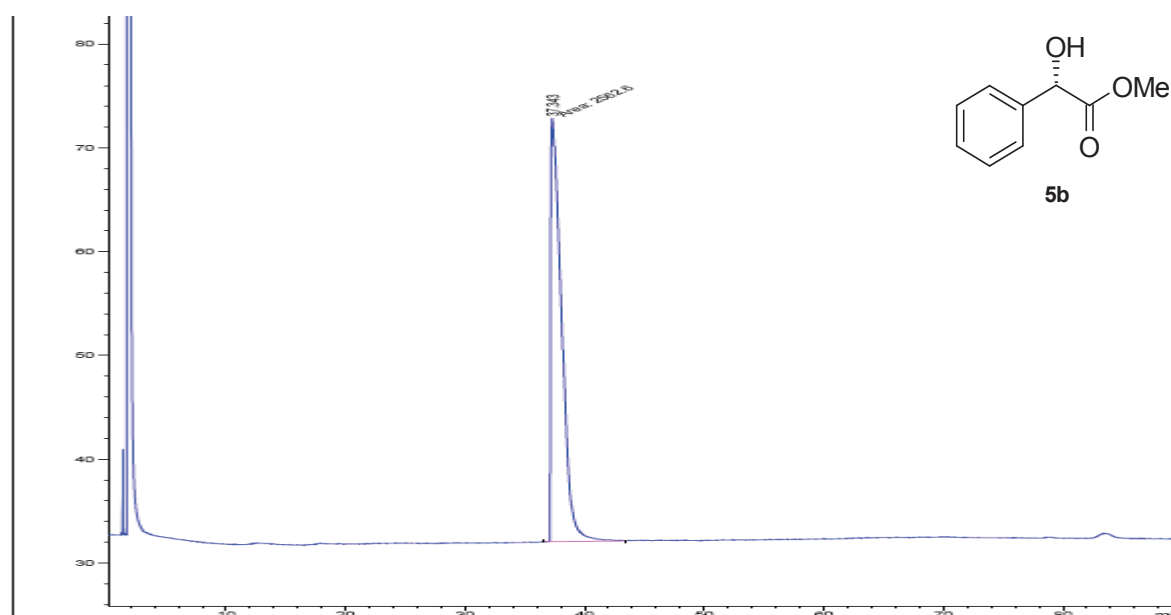
	$C_9H_{10}O_3$ MM = 166,1782 g.mol ⁻¹ Poudre blanche Pf. : 56°C
---	---

Obtenu comme produit de départ restant par les méthodes **K**, **L**, ou **M**

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
K	30	82	61
L	100	82	10
M	30	75	39

Conditions CPG : Montée de 80°C à 110° à 2°C/min (20 minutes) puis montée de 110°C à 180°C à 2°C/min.tr : 37.3 min

[α]_D : +142° (c = 1,0 CHCl₃)



Chromatogramme du (S)-mandélate de méthyle

ν (cm⁻¹) : 3437, 2955, 1739, 1208, 737.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm): 7,32-7,45 (m, 5H, H_{arom}); 5,18 (s, 1H, H₂); 3,77 (s, 3H, H_{1'}); 3,45(s, 1H, OH).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 174,1 (C₁) ; 138,2 (C₃); 128,6 (C_{arom}); 128,5 (C_{arom}) ; 126,6 (C_{arom}); 72,9(C₂); 53,0 (C_{1''}).

(R)-N-Allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (6a)

	$C_{11}H_{13}NO_2$ MM = 191,2318 g.mol ⁻¹ Huile incolore
--	---

Le produit est obtenu par la méthode **K**, **L**, ou **M**

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
K	80	82	61
L	100	82	10
M	80	75	39

Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte, à une solution de 0,6 mmol de mandélate de méthyle énantio pur (**5a**) (100 mg) solubilisé dans 1 mL de trifluorotoluène est ajoutée l'allylamine (0,9mL, 1,2 mmol). Le mélange est chauffé sous irradiation micro-onde en système fermé (Biotage Initiator eight) à 200°C pendant 2 heures. Après évaporation du brut réactionnel et purification par chromatographie sur colonne (DCM 100%) le *N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6a**) et le mandélate de méthyle (**5a**) restants sont isolés à l'état pur.

Ou :

A une solution d'acide mandélique (1.2mmol, 200mg) (**13**) solubilisé dans 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés successivement 2.4 mmol, (0.19mL) d'allylamine, 296 mg (1,44 mmol) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide et 40 mg (0.24 mmol) de diméthylaminopyridine. Le mélange est agité pendant 12 heures à température ambiante. Le brut réactionnel est ensuite extrait au dichlorométhane (3x10mL); lavé à la saumure (20 mL). Les phases organiques sont ensuite rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium et évaporées. Une chromatographie sur colonne (DCM 100%) permet d'obtenir à l'état pur le produit (**6a**) avec un rendement de 84% (192 mg, 1,00 mmol).

Synthèse enzymatique :

Sous atmosphère inerte, à une solution de 1,2 mmol de mandélate de méthyle énantiopur (**5a**) et d'allylamine (2,4 mmol, 0,19mL) solubilisés dans 25mL de *tert*-butanol sont ajoutés 200mg de lipase B de *Candida antarctica* solubilisée sur résine acrylique (2000U). Après chauffage au bain-marie pendant 48 heures à 45 °C, la lipase est filtrée sur verre fritté, et le solvant est évaporé sous pression réduite. Une chromatographie sur colonne (DCM 100%) permet d'obtenir à l'état pur le (*R*)-*N*-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide énantio purs (**6a**).

Conditions CPG : 90 minutes à 140°C. tr : 68,4 min

[α]_D : -69,7° (c = 1,0, MeOH)

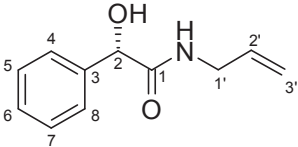
ν (cm⁻¹) : 3304, 2921, 1654, 1641, 1525, 1061.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 7,08-7,21 (m, 5H, **Harom**); 6,66 (s, 1H, **NH**); 5,65-5,81 (m, 1H, **H2'**); 5,00-5,10 (m, 2H, **H3'**); 4,93 (s, 1H, **H2**); 3,95 (s, 1H, **OH**); 3,74-3,81 (m, 2H, **H1'**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 172,1 (**C1**) ; 139,2 (**C3**) ; 133,1 (**Carom**) ; 128,0 (**Carom**) ; 127,7 (**Carom**) ; 126,2 (**C3'**) ; 115,8 (**C2'**) ; 73,7 (**C2**) ; 41,0 (**C1'**).

SMHR calculée pour C₁₁H₁₃NO₂Na : 214.0844, trouvée : 214.0841

(S)-N-Allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (6b)

	$C_{11}H_{13}NO_2$ MM = 191,2318 g.mol ⁻¹ Huile incolore
---	---

Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte d'argon, à une solution de 0,6 mmol de mandélate de méthyle énantio pur (**5b**) (100 mg) solubilisé dans 1 mL de trifluorotoluène est ajoutée l'allylamine (0,9mL, 1,2 mmol). Le mélange est chauffé sous irradiation micro-onde en système fermé à 200°C pendant 2 heures. Après évaporation du brut réactionnel et purification par chromatographie sur colonne (DCM 100%), le (*S*)-N-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**6b**) et le mandélate de méthyle (**5b**) restants sont obtenus à l'état pur.

Synthèse enzymatique :

Sous atmosphère inerte, à une solution de 1,2 mmol de mandélate de méthyle énantio pur (**5b**) et d'allylamine (2,4 mmol, 0,19mL) solubilisés dans 25mL de *tert*-butanol sont ajoutés 200 mg de lipase B de *Candida antarctica* solubilisée sur résine acrylique (2000U). Après chauffage au bain-marie pendant 48 heures à 45 °C, la lipase est filtrée sur verre fritté, et le solvant est évaporé sous pression réduite. Une chromatographie sur colonne de silice (DCM 100%) permet d'obtenir à l'état pur le (*S*)-N-allyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide énantio pur (**6b**).

Conditions CPG : 90 minutes à 140°C. tr : 68,1 min

$[\alpha]_D^{20}$: +70,0° (c = 1,0, MeOH)

ν (cm⁻¹) : 3304, 2921, 1654, 1641, 1525, 1061.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 7,08-7,21 (m, 5H, **Harom**); 6,66 (s, 1H, **NH**); 5,65-5,81 (m, 1H, **H2'**); 5,00-5,10 (m, 2H, **H3'**); 4,93 (s, 1H, **H2**); 3,95 (s, 1H, **OH**); 3,74-3,81 (m, 2H, **H1'**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 172,1 (**C1**) ; 139,2 (**C3**) ; 133,1 (**Carom**) ; 128,0 (**Carom**) ; 127,7 (**Carom**) ; 126,2 (**C3'**) ; 115,8 (**C2'**) ; 73,7 (**C2**) ; 41,0 (**C1'**).

(R)-O-Acétyl mandélate de méthyle (7a)

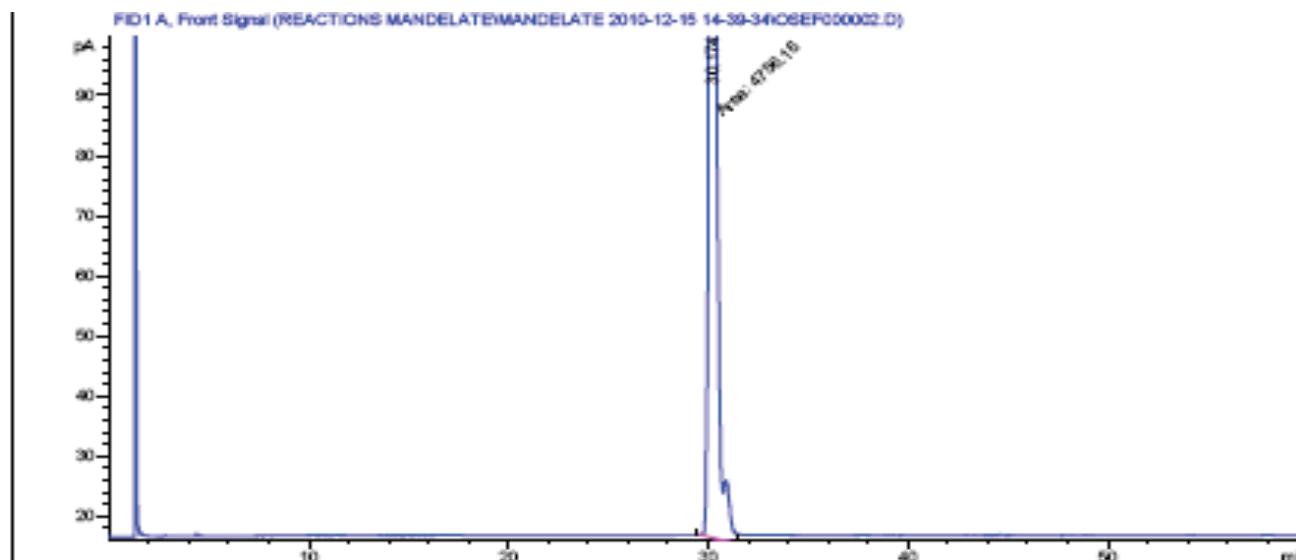
	$C_{11}H_{12}O_4$ MM = 208,2159 g.mol ⁻¹ Huile incolore
--	--

Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte, 1,2mmol de mandélate de méthyle (**5a**) sont dissouts dans 1,5mL de pyridine. Le mélange est refroidi à 0°C dans un bain de glace. L'anhydride acétique (2 mmol) est ajoutée goutte à goutte. Après deux heures sous agitation, le mélange est extrait trois fois au dichlorométhane (3 x 15mL), lavé deux fois à l'eau (15mL) puis à l'acide acétique 1M (15mL). Après séchage de la phase organique sur sulfate de magnésium, et évaporation sous vide, une chromatographie sur colonne (DCM 100%) permet d'obtenir à l'état pur le (R)-O-acétyl mandélate de méthyle (**7a**).

Conditions CPG Montée de 80°C à 110° à 2°C/min (40 minutes).tr : 31,4 min

$[\alpha]_D$: -122° (c = 1,1, CHCl₃)



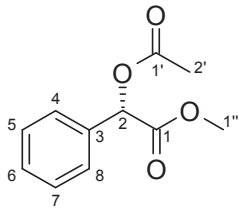
Chromatogramme du (*R*)-*O*-acétyl-mandélate de méthyle

ν (cm⁻¹) : 2961, 1743, 1697, 1236, 1131, 781.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 7,35-7,48 (m, 5H, **Harom**); 5,93 (s, 1H, **H2**); 3,70 (s, 3H, **H1''**); 2,18 (s, 3H, **H2'**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 170,6 (**C1** ou **C1'**) ; 169,6 (**C1** ou **C1'**) ; 133,9 (**C3**) ; 129,5 (**Carom**) ; 128,9 (**Carom**) ; 127,9 (**Carom**) ; 74,6 (**C2**) ; 52,7 (**C1''**) ; 20,8 (**C2'**).

(S)-O-Acétyl mandélate de méthyle (7b)

	$C_{11}H_{12}O_4$ MM = 208,2159 g.mol ⁻¹ Huile incolore
---	--

Obtenu par les méthodes **O**, **P**, **Q**.

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
O	35	50	>99,9
P	100	36	90
Q	35	31	97

Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte, 1,2 mmol de mandélate (**5b**) sont dissous dans 1,5mL de pyridine. Le mélange est refroidi à 0°C à l'aide d'un bain de glace. L'anhydride acétique (2 mmol) est ajouté goutte à goutte. Après deux heures sous agitation à basse température, le mélange est extrait trois fois de suite au dichlorométhane, lavé deux fois à l'eau (15mL) puis à l'acide acétique 1M (15mL). Après séchage de la phase organique sur sulfate de magnésium, et évaporation sous vide, la chromatographie sur colonne (DCM 100%) permet d'obtenir à l'état pur le O-acétyl mandélate de méthyle énantipur (**7b**).

Conditions CPG Montée de 80°C à 110° à 2°C/min (40 minutes) tr : 30,2 min

$[\alpha]_D^{20}$: +122,0° (c = 1,1, CHCl₃)

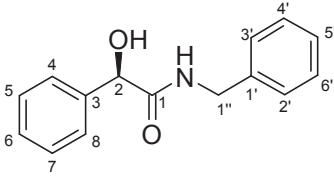
ν (cm⁻¹) : 2961, 1743, 1697, 1236, 1131, 781.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 7,35-7,48 (m, 5H, **Harom**); 5,93 (s, 1H, **H2**); 3,70 (s, 3H, **H1''**); 2,18 (s, 3H, **H2'**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 170,6 (**C1** ou **C1'**) ; 169,6 (**C1** ou **C1'**) ; 133,9 (**C3**) ; 129,5 (**Carom**) ; 128,9 (**Carom**) ; 127,9 (**Carom**) ; 74,6 (**C2**) ; 52,7 (**C1''**) ; 20,8 (**C2'**).

SMHR calculée pour C₁₁H₁₂O₄Na : 231.06333 trouvé : 231.0631

(R)-N-Benzyl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (**12**)

	<p>C₁₅H₁₅NO₂ MM = 241,2933 g.mol⁻¹ Poudre blanche Pf : 134°C Rdt : 74%</p>
--	--

Le produit est obtenu par la méthode N (80°C)

Méthode	Rdt (%)	ee (%)
N	24	0

Synthèse chimique :

A une solution d'acide mandélique (1.2mmol, 200mg) (**13**) solubilisé dans 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés successivement 2.4 mmol, (256 mg) de benzylamine, 296 mg (1,44 mmol) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide et 40 mg (0.24 mmol) de diméthylaminopyridine. Le mélange est agité pendant 12 heures à température ambiante. Après extraction au dichlorométhane (3x10mL) et lavage à la saumure (20 mL), les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium et évaporées. Une

chromatographie sur colonne (DCM 100%) permet d'obtenir à l'état pur le produit **(12)** avec un rendement de 74% (0,89 mmol, 214 mg).

$[\alpha]_D^{20}$: -80,2° (c = 1,0, CHCl₃)

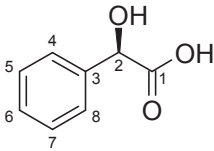
ν (cm⁻¹) : 3406, 3178, 1646, 1534.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 7,25-7,44 (m, 8H, **Harom**); 7,15-7,20 (m, 2H, **Harom**); 6,48 (s, 1H, **H2**); 5,07 (s, 1H, **NH**); 4,30-4,50 (m, 2H, **H1''**); 3,61 (s, 1H, **OH**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 172,0 (**C1**); 139,4 (**C3**); 137,7 (**C2'**); 128,9 (**Carom**); 128,7 (**Carom**); 127,5 (**Carom**); 127,6 (**Carom**); 126,9 (**Carom**); 126,8 (**Carom**); 74,2 (**C2**); 43,6 (**C1''**).

SMHR calculée pour C₁₅ H₁₅ N O₂ Na : 264.10005, trouvée : 264.0999.

Acide (*R*)-2-hydroxyphénylacétique ou (*R*)-acide mandélique (**13**)

	<p>C₈H₈O₃ MM = 152.1512g.mol⁻¹ Poudre blanche Pf. : 131°C Rdt : 95%</p>
---	---

Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte d'argon, à une solution de 1.2 mmol de mandélate de méthyle (**5a**) agité vigoureusement dans un mélange méthanolique aqueux (1 : 1 : 10mL) sont ajoutés 2 équivalents de soude (2.4 mmol, 97 mg) par petites spatulées. Le mélange est agité à température ambiante pendant 4 heures. Le brut réactionnel est ensuite extrait 5 fois à l'acétate d'éthyle (10mL). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de magnésium. Après évaporation du solvant, une recristallisation à chaud dans 3 ml de dichloroéthane, l'acide mandélique (**13**) est obtenu à l'état pur avec un rendement de 95%.

$[\alpha]_D$: -150,8° (c = 1,0, H₂O)

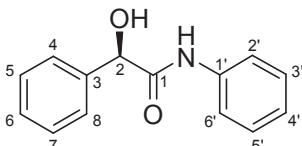
ν (cm⁻¹) : 3401, 2967, 1708, 1455, 1228, 697.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 7,18-7,31 (m, 5H, Harom); 5,0 (s, 1H, H₂); 3,4 (s, 1H, OH).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 174,0 (C1) ; 140,0 (C3) ; 128,2 (Carom) ; 127,5 (Carom) ; 126,6 (Carom) ; 72,1 (C2).

SMHR calculée pour C₈H₇O₃Na₂ : 197.01906 trouvé : 197.0193

(R)-N-Phényl-2-hydroxy-2-phénylacétamide (14)

	<p>C₁₄H₁₃NO₂ MM = 227,2652 g.mol⁻¹ Huile incolore Pf : 134°C Rdt : 79%</p>
--	--

Synthèse chimique :

A une solution d'acide mandélique (1,2mmol, 200mg) (**13**) solubilisé dans 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés successivement 2,4 mmol, (223 mg) d'aniline, 296 mg (1,44 mmol) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide et 40 mg (0.24 mmol) de diméthylaminopyridine. Le mélange est agité pendant 12 heures à température ambiante. Le brut réactionnel est extrait au dichlorométhane (3x10mL) et lavé à la saumure (20 mL). Les phases organiques sont ensuite rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium et évaporées. Une chromatographie sur gel de silice (DCM 100%) permet d'obtenir à l'état pur le produit (**14**) avec un rendement de 79% (0,95 mmol, 215 mg).

$[\alpha]_D$: -78,0° (c = 1,0, CHCl₃)

ν (cm⁻¹) : 3307, 3061, 1650, 1601, 1559, 1444, 754, 693.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 7,57 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, **H2'** et **H6'**); 7,20-7,90 (m, 6H, **Harom**); 6,95-6,99 (m, 2H, **Harom** et **NH**); 5,1 (s, 1H, **H2**); 3,5 (s, 1H, **OH**).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 170,0 (**C1**) ; 139,4 (**C1'** ou **C3**) ; 137,2 (**C1'** ou **C3**) ; 128,4 (**Carom**); 127,9 (**Carom**) ; 127,6 (**Carom**) ; 126,3 (**Carom**) ; 123,7 (**Carom**) ; 119,2 (**Carom**) ; 73,8 (**C2**).

**Chapitre IV : Etude de la résolution de polyols
par des lipases**

La synthèse de molécules à plusieurs centres chiraux est un véritable challenge pour le chimiste organicien. Ces molécules polyhydroxylées sont retrouvées dans un grand nombre d'antibiotiques ¹⁹³, antifongiques ¹⁹⁴, anticancéreux ¹⁹⁵, antiparasitaires ¹⁹⁶ et sont présentes dans le monde marin ou terrestre, chez les bactéries ou chez les organismes supérieurs ¹⁹⁷, ¹⁹⁸. Le grand nombre de centres chiraux rendent leur synthèse difficile (Figure 27).

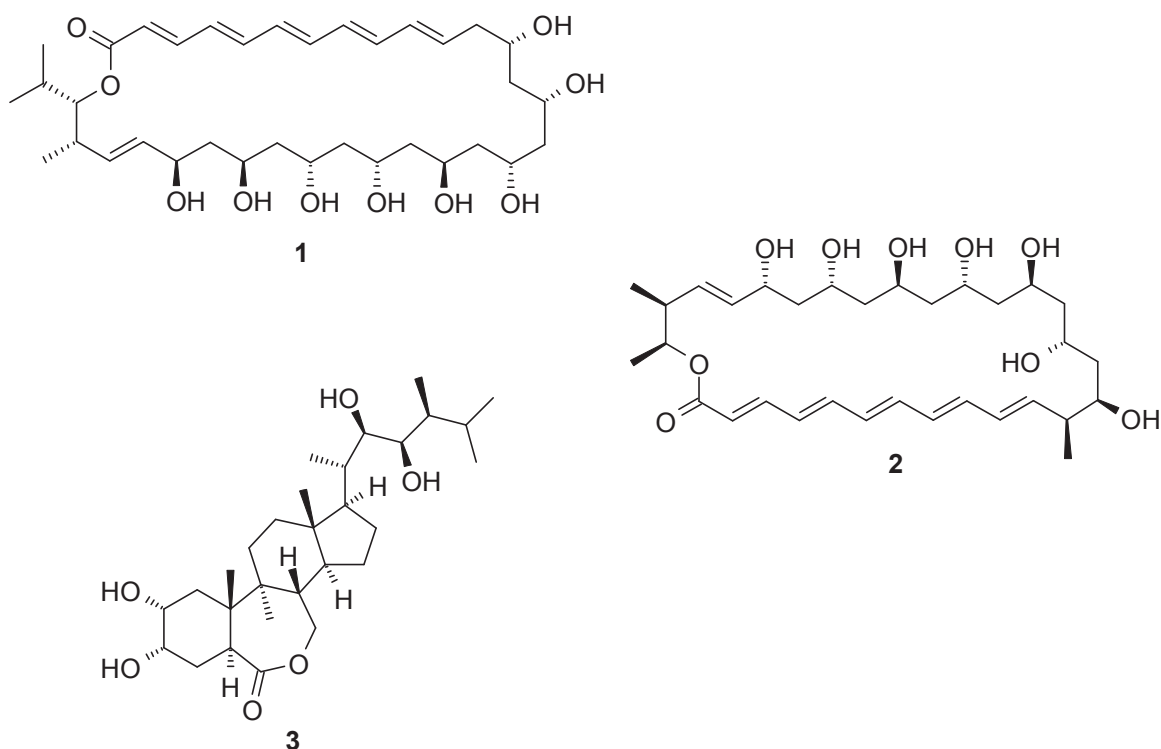


Figure 27 : Structure de RK-397 (1) et de la Roxaticine (2) et du Brassinolide (3)

Dans la nature, ces molécules complexes sont synthétisées par des polycétides synthèses par le biais de sous unités malonyl-CoA issus de la biosynthèse des acides gras ¹⁹⁹.

¹⁹³ Isaka M., Palasarn S., Auncharoen P., Komwijit S., Jones G. Acremoxanthones A and B, novel antibiotic polyketides from the fungus *Acremonium* sp. BCC 31806. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 284-287.

¹⁹⁴ Tomishima M., Ohki H., Yamada A., Maki K., Ikeda F. Novel echinocandin antifungals. Part 1: Novel side-chain analogs of the natural product FR901379. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, 18, 1474-1477.

¹⁹⁵ Smith A., Freeze S. (+)-Discodermolide: total synthesis, construction of novel analogues, and biological evaluation. *Tetrahedron*. **2008**, 64, 261-298.

¹⁹⁶ Mishra B., Tiwari V. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, 46, 4769-4807.

¹⁹⁷ Koh C., Kini M. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. *Toxicol.* **2011**, doi:10.1016/j.toxicol.2011.03.017.

¹⁹⁸ Fu F., Loh T.P. An asymmetric synthesis of the polyol fragment of the polyene macrolide antibiotic RK-397. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 3530-3533.

¹⁹⁹ Kalaitzis J., Cheng Q., Meluzzi D., Xiang L., Izumikawa M., Dorrestein P., Moore B. Policing starter unit selection of the enterocin type II polyketide synthase by the type II thioesterase EnCL. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2011**, 19, 6633-6638.

Le rôle exact de cette multitude d'enzymes est mal connu et est difficilement exploitable pour une application directe en synthèse organique.

Pour synthétiser efficacement ces macrolides, la synthèse et la résolution de précurseurs simples est une voie de synthèse généralement appliquée avec succès. Ces précurseurs possèdent généralement un nombre restreint de centres asymétriques, les rendant plus simples à synthétiser²⁰⁰.

Afin de résoudre ces précurseurs, des catalyseurs chiraux chimiques ou enzymatiques peuvent être efficacement employés²⁰¹.

Poursuivant nos travaux sur l'exploration de nouvelles méthodologies de synthèse de molécules chirales, la résolution par voie enzymatique de molécules polyhydroxylées, dont les diols cycliques homochiraux ou des triols sera étudiée dans ce chapitre.

PARTIE I. Synthèse et résolution de dérivés diols cycliques homochiraux

Les diols cycliques sont employés comme précurseurs de nombreuses molécules utilisables en parfumerie, ou comme catalyseurs chiraux^{202, 203}.

Pour séparer efficacement ces diols, de nombreuses méthodologies existent, par catalyse chimique ou enzymatique.

²⁰⁰ Bonini C., Chiumminto L., Funicello M., Lupattelli P., Videtta V. A first convergent synthesis of the polyolic fragment of the antifungal pentaene macrolide strevertene A. *Tetrahedron Letters*. **2008**, 49, 5455-5457.

²⁰¹ Ye Z., Gao T., Zhao G. Enantioselective total synthesis of the proposed structure of macrolide iriomoteolide-1b. *Tetrahedron*. **2011**, 67, 5979-5989.

²⁰² Tanaka M., Toyofuku E., Demizu Y., Yoshida O., Nakazawa K., Sakai K., Suemune H. Asymmetric ring cleavage reaction with a combination of optically active cycloalkane-1,2-diol and Lewis acid: application to formal synthesis of (-)-alloyohimbane and approach to construction of adjacent chiral quaternary centers. *Tetrahedron*. **2004**, 60, 2271-2281.

²⁰³ Olsson C., Friberg A., Frejd T. Bicyclic diols and related derivatives as catalysts for the asymmetric diethylzinc addition to benzaldehyde. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2008**, 19, 1473-1483.

I. Aspect bibliographique

1. Résolution de diols par catalyse chimique

Les méthodes chimiques reposent sur la synthèse et le clivage sélectif d'acétals²⁰⁴, ou encore sur l'emploi de catalyseurs chiraux le Cu(III) associés à des ligands (Schéma 103)²⁰⁵.

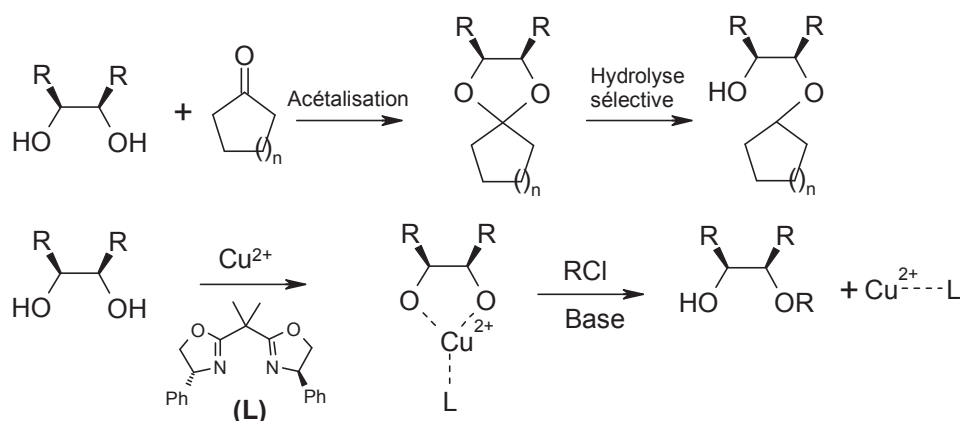


Schéma 103 : Exemples de résolutions chimiques de diol *meso*

Par la méthode employant un ligand chiral complexé au triflate de cuivre, il est par exemple possible d'obtenir, lors de la déracémisation du cyclooctan-1,2-diol par monotosylation, un rendement de 91% et un excès énantiomérique de 97% (Schéma 104)²⁰⁶.

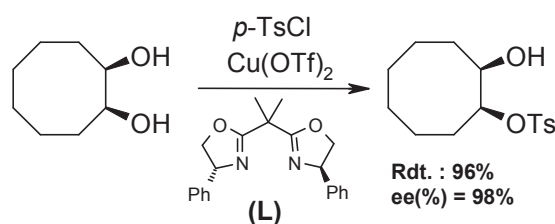


Schéma 104 : Monotosylation du cyclooctan-1,2-diol

²⁰⁴ Wakita N., Hara S. Selective mono-acylation of 1,2- and 1,3-diols using (α,α -difluoroalkyl)amines. *Tetrahedron*. **2010**, 66, 7939-7945.

²⁰⁵ Onomura O., Arimoto H., Matsumura Y., Demizu Y. Asymmetric oxidation of 1,2-diols using N-bromosuccinimide in the presence of chiral copper catalyst. *Tetrahedron Letters*. **2007**, 48, 8668-8672.

²⁰⁶ Demizu Y., Matsumoto K., Onomura O., Matsumura Y. Copper complex catalyzed asymmetric monosulfonylation of *meso*-vic-diols. *Tetrahedron Letters*. **2007**, 48, 7605-7609.

Le principal désavantage lors de la résolution de diol par catalyse chimique est la relative toxicité des catalyseurs chimiques et la pollution de l'environnement par les métaux. Afin de séparer les énantiomères de façon plus douce, la résolution enzymatique est utilisée comme alternative de choix aux méthodes chimiques.

2. Résolution de diols par catalyse enzymatique

Différentes méthodes de séparation d'énantiomères peuvent être employées pour la résolution de diols.

La première méthode repose sur l'acétylation énantiosélective d'une des deux fonctions alcool pour aboutir, par monoacétylation, ou diacétylation à un produit résolu (Schéma 105)²⁰⁷.

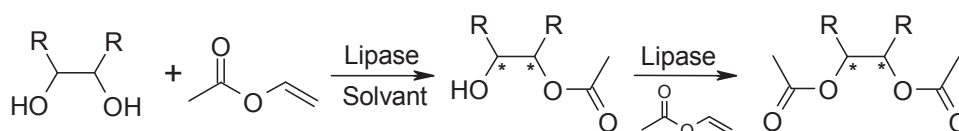


Schéma 105 : Voie d'obtention d'un diol monoprotégé par utilisation de lipases

La seconde méthode repose sur la réaction inverse, l'hydrolyse d'un produit de type diacétylé, qui, en condition d'hydrolyse, est résolu par des hydrolases pour former un monoacétate ou un diol énantiopur (Schéma 106).

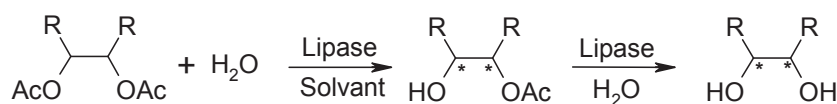


Schéma 106 : Hydrolyse sélective de diacétates par des lipases

Il existe, dans la littérature diverses méthodologies pour la résolution de diols homochiraux, par hydrolyse ou acétylation énantiosélective.

²⁰⁷ Csaba Bencze L., Paizs C., Ioana Toşa M., Dan Irimie F. Sequential use of regio- and stereoselective lipases for the efficient kinetic resolution of racemic 1-(5-phenylfuran-2-yl)ethane-1,2-diols. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2011**, 22, 675-683.

1. Résolution de diols par hydrolyse énantiosélective

- Résolution de 3,4-dihydroxytétrahydrofuranes par hydrolyse énantiosélective

La résolution de dérivés dihydroxytétrahydrofuranes par utilisation de *Pseudomonas cepacia* a été réalisée par hydrolyse en conditions douces, dans un mélange tampon phosphate et dioxane, à 30 °C pendant 31 heures (Schéma 107)²⁰⁸.

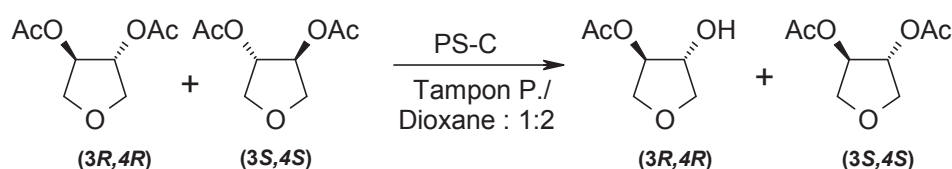


Schéma 107 : Résolution du 3,4-dihydroxytétrahydrofurane par hydrolyse énantiosélective

Lors de cette hydrolyse, le produit monoacétylé est retrouvé avec un rendement de 51 % et un excès énantiomérique de 95%. La lipase B de *Candida antarctica* ne permet pas cette résolution dans les mêmes conditions.

Par acétylation sélective du mélange racémique de tétrahydrofuran-3,4-diol, la lipase B de *Candida antarctica* et la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur céramique ont une énantio-préférence opposée : la LBCA est partiellement sélective de la formation du monobenzoate de configuration (3S,4R)-tétrahydrofuran-3,4-diol, alors que la lipase de *Pseudomonas cepacia* immobilisée sur céramique permet l'acétylation conduisant au monobenzoate de configuration (3R,4S)-tétrahydrofuran-3,4-diol, avec une sélectivité et une conversion très similaire (Schéma 108).

²⁰⁸ Recuero V., Brieva R., Gotor V. Highly enantioselective transformations on 3,4-dihydroxytetrahydrofurans catalyzed by lipases. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2008**, 19, 1684-1688.

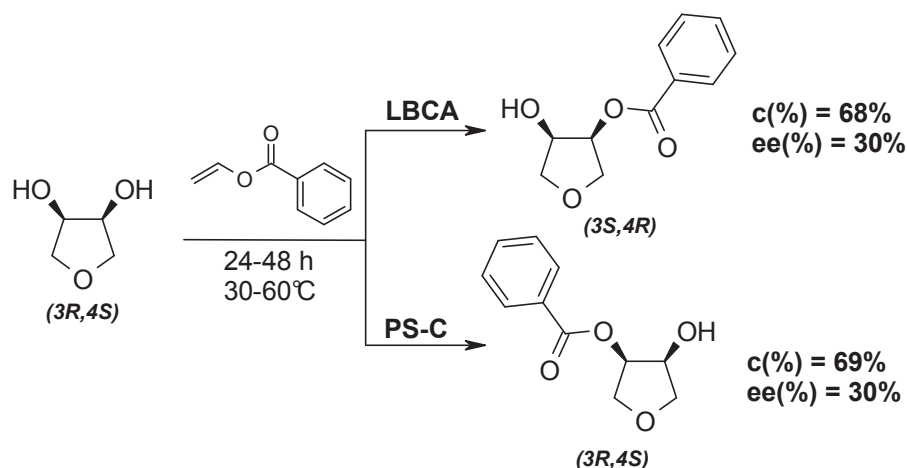


Schéma 108 : Acétylation du tétrahydrofuran-3,4-diol racémique biocatalysée par les lipases B et de *Candida antarctica* et la lipase de *Pseudomonas cepacia*.

- Résolution de dérivés cyclohexéniques par hydrolyse énantiosélective

La synthèse de di- et tétra-ol dérivés du cyclohexène a été conduite par l'équipe de Suemune²⁰⁹.

L'hydrolyse énantiosélective du mélange racémique de diacétate du cyclohexèn-3,4-diol a été réalisée par l'utilisation de la lipase de *Pseudomonas fluorescens*, en deux étapes. La saponification des mono- et diesters permet d'obtenir des diols correspondant avec un très bon taux de conversion et excès énantiomériques (Schéma 109).

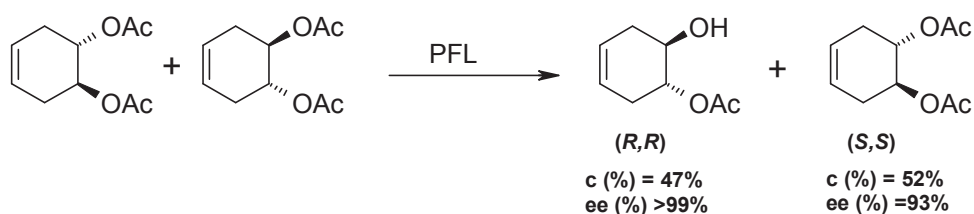


Schéma 109 : Résolution énantiosélective de diester de symétrie C1-C2 par hydrolyse énantiosélective

²⁰⁹ (a) Suemune H., Hasegawa A., Sakai K. Highly enantio- and diastereo-selective synthesis of C2-symmetric 3,5-cyclohexadiene-1,2-diol and D2-symmetric cyclohexane-1,2,4,5-tetrol. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1995**, 6, 55-58. (b) Suemune H., Hizuka M., Kamashita T., Sakai K. Preparation of optically active γ -hydroxyethyl α , β -unsaturated γ -lactone using an enzymatic procedure. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1989**, 37, 1379-1381.

2. Résolution de dérivés diols par acétylation énantiosélective.

La résolution du cyclo-octan-1,2-diol monoprotégé a été réalisée par Bodai, par estérification énantiosélective en présence de diverses lipases (Schéma 110)²¹⁰.

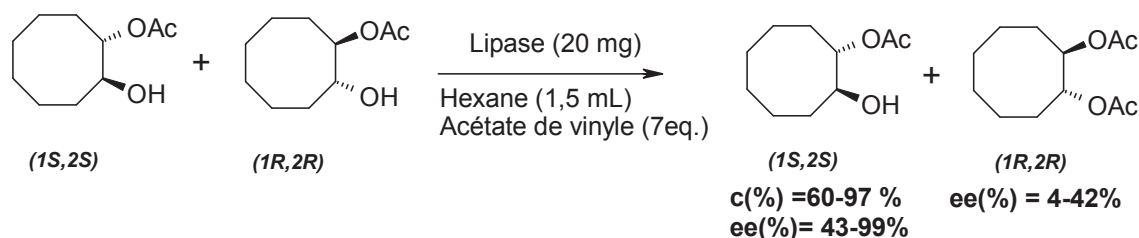


Schéma 110 : Acétylation du *trans*-2-acétoxyoctanol

Selon la lipase utilisée, le rendement obtenu lors de l'acétylation énantiosélective varie de façon importante. Dans tous les cas, la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (Novozyme 435) se révèle être le meilleur biocatalyseur pour la résolution du monoacétate, avec une conversion de 97% et un excès énantiomérique retrouvé de 99%.

II. Synthèse et résolution de diols cycliques homochiraux pour la synthèse de précurseurs de jasmonate de méthyle

Dans la synthèse du jasmonate de méthyle, les fonctions alcools secondaires et la jonction de cycle prédéfinissent respectivement la stéréochimie des cucurbates et des *cis*-jasmonates de méthyle, il donc est essentiel de contrôler la stéréochimie des quatre centres asymétriques (Schéma 111). Dans la synthèse totale de ces dérivés jasmoniques, Emmanuel Deau a, durant son doctorat, réalisé une synthèse originale de stéréomères du jasmonate de méthyle en utilisant des diols homochiraux comme précurseurs efficaces de synthèse²¹¹.

²¹⁰ Bódai V., Orovecz O., Szakács G., Novák L., Poppe L. Kinetic resolution of *trans*-2-acetoxycycloalkan-1-ols by lipase-catalysed enantiomerically selective acylation. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2003**, 14, 2605-2612.

²¹¹ Deau E. Synthèse asymétrique de l'épi-jasmonate de méthyle et de son énantiomère (*ent*-épi-jasmonate de méthyle) par voie chimique et enzymatique. **2011**. *Thèse de Doctorat*. Université de La Rochelle, 87-109.

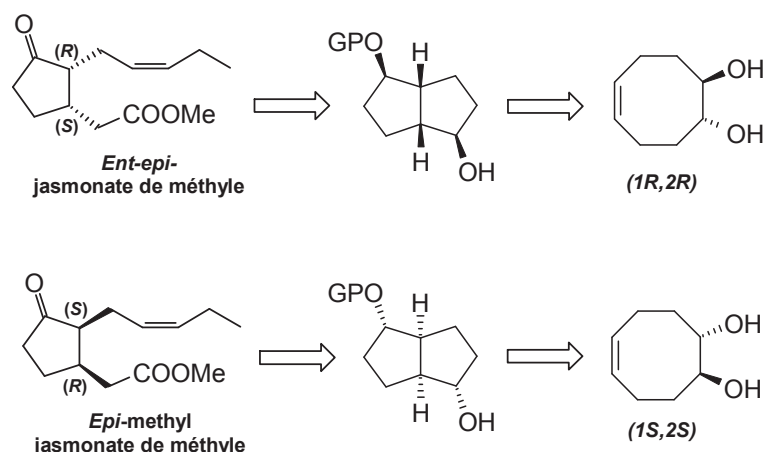


Schéma 111 : Structure des *épi-* et *ent-épi* jasmonates de méthyle au départ de diol chiraux

Chaque diastéréomère du jasmonate de méthyle peut être obtenu au départ d'un diol bicyclique résolu. Ces diols bicycliques peuvent quant à eux être synthétisés à partir de diols homochiraux.

Dans le cadre de nos recherches concernant la résolution énantiosélective de diols homochiraux monocycliques par des lipases, nous avons envisagé une méthodologie originale quant à la résolution de ces diols homochiraux. La synthèse de ces diols a été conduite au départ d'un précurseur achiral simple : le cycloocta-1,5-diène (COD) (Schéma 112).

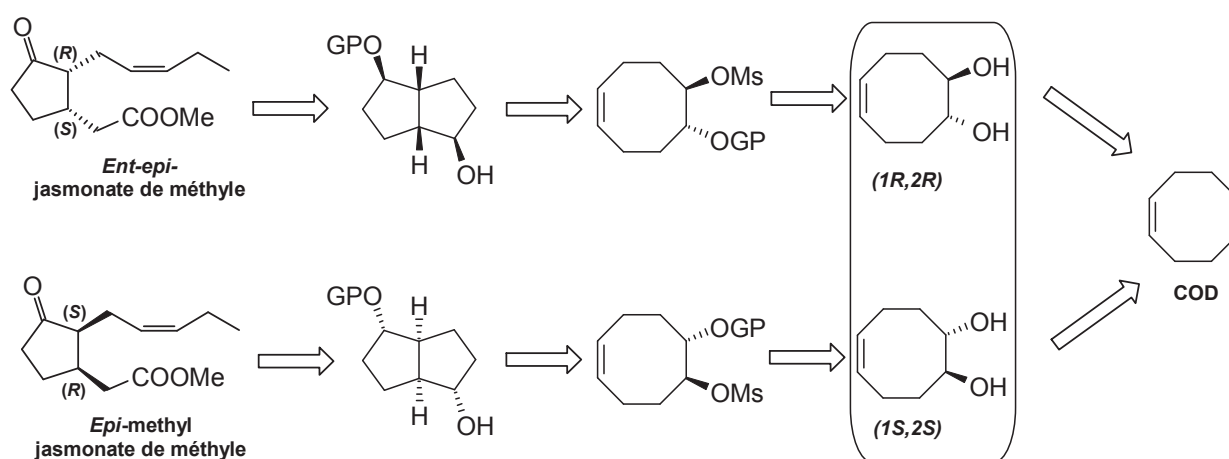


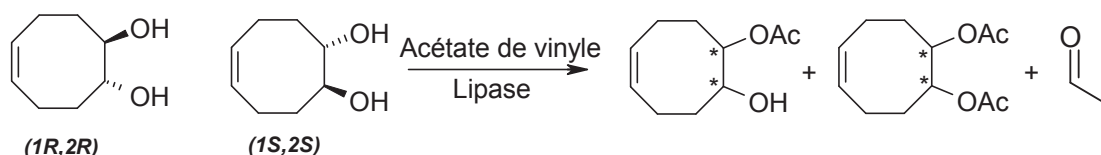
Schéma 112 : Synthèse de l'*épi-* et *ent-épi* jasmonate de méthyle au départ des diols (1S, 2S) et (1R, 2R)

Les diols homochiraux sont des intermédiaires de départ clés guidant l'énantiosélectivité du jasmonate de méthyle finale.

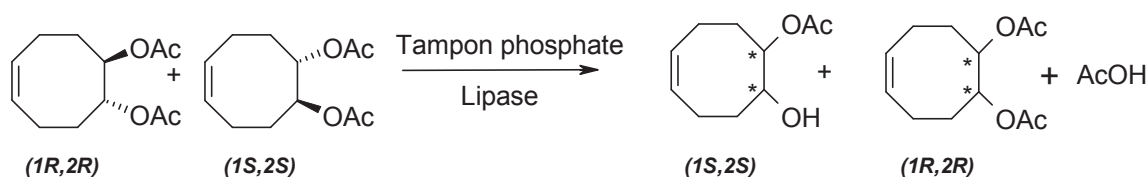
Il est donc impératif de contrôler efficacement la chiralité des diols par des résolutions enzymatiques afin d'obtenir le jasmonate de méthyle recherché.

1. Résolution de diol homochiraux par voie enzymatique

Poursuivant les travaux de recherche effectués au laboratoire, nous nous sommes intéressés à la résolution des diol homochiraux (*1R,2R*) et (*1S,2S*) en présence de lipases. Afin de discriminer efficacement les deux énantiomères, une séparation enzymatique a été envisagée par acétylation énantiosélective ou par hydrolyse. (Schéma 113).



Résolution par acétylation



Résolution par hydrolyse

Schéma 113 : Résolution des diols cycliques par acétylation ou hydrolyse énantiosélective

La synthèse et la séparation efficace des deux diols (*1R,2R*) et (*1S,2S*) par voie enzymatique sera tentée en utilisant des lipases, en synthèse conventionnelle ou sous irradiation micro-onde.

Afin d'accéder au mélange de diols homochiraux, la préparation de ces composés a été réalisée au départ d'un précurseur facilement disponible : le cycloocta-1,5-diène.

1. Synthèse du (Z)-(1S,8R)-9-oxa-bicyclo[6.1.0]non-4-ène

L'époxydation du cyclo-octa-1,5-diène a été réalisée en présence de l'acide peracétique, dans le dichlorométhane à 0°C (Schéma 114). Le *méso*-époxyde (**15**) est obtenu avec un excellent rendement de 96%. La synthèse chimique est réalisable à grande échelle (20g).

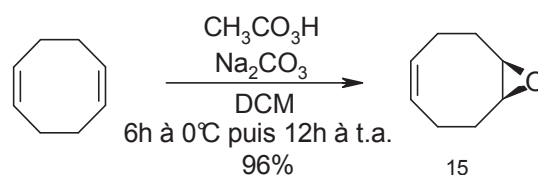


Schéma 114 : Synthèse du *méso*-époxyde au départ du cyclo-octa-1,5-diène

2. Hydrolyse du *méso*-époxyde (**15**)

L'ouverture du *méso*-époxyde (**15**) par addition de l'acide sulfurique aqueux, à température ambiante conduit au mélange de diols (**16**) avec un modeste rendement de 65% (Schéma 115).

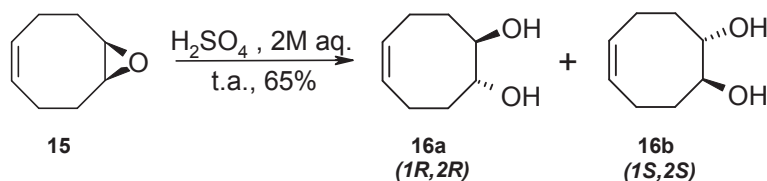


Schéma 115 : Ouverture du *méso*-époxyde

3. Acétylation du diol homochiral (**16**)

Afin d'étudier des réactions d'hydrolyse énantiosélective, l'acétylation des diols a été réalisée en présence d'anhydride acétique, dans la pyridine à 0°C. Le mélange racémique de diacétates (**17**) est obtenu avec un excellent rendement de 94% (Schéma 116).

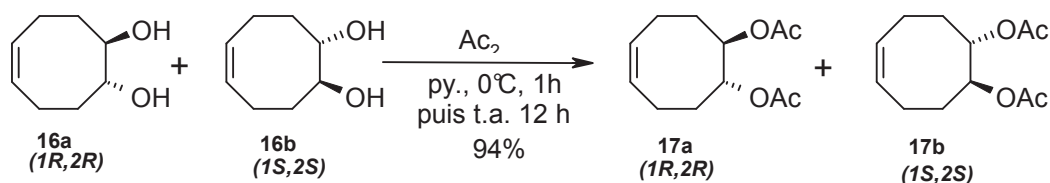


Schéma 116 : Acétylation du diol homochiral racémique

Mettant à profit notre savoir faire en catalyse enzymatique, la désymétrisation des diols racémiques (**16**) et des diacétates (**17**) racémiques a été étudiée par acétylation ou hydrolyse énantiosélective en présence de lipases.

Les paramètres enzymatiques tels que la température ou le choix du solvant ont été étudiés afin d'optimiser cette résolution.

2. Etude de la résolution des diols homochiraux par acétylation énantiosélective

1. Résolution du diol racémique par acétylation énantiosélective en présence de la lipase B de *Candida antarctica* à 35°C

L'acétylation du diol monocyclique homochiral (**16**) a tout d'abord été envisagée par acétylation énantiosélective en présence de la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (Novozyme 435).

Cette acétylation a été réalisée à l'aide de l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle, en chauffage conventionnel, à 35°C, dans divers solvants organiques (Schéma 117).

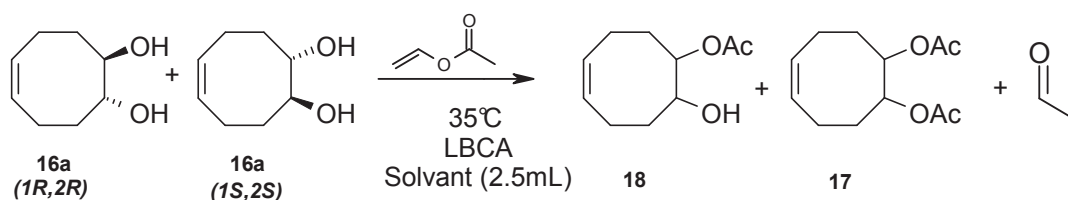
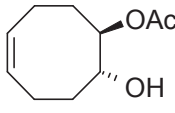
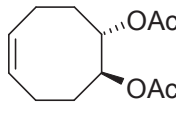


Schéma 117 : Résolution du diol homochiral par acétylation énantiosélective en présence de la lipase B de *Candida antarctica*

Après purification des produits, la conversion et la sélectivité enzymatique ont été calculées. Les excès énantiomériques ont été d'une part obtenus par chromatographie en phase gazeuse et aussi confortés par la mesure de leur pouvoir rotatoire (Tableau 35).

Solvant	Temps (jour)	 18a		 17b		
		Rdt. (%)	ee (%) ^(a)	Rdt. (%)	ee (%) ^(a)	[α] _D (°)
THF	22	28	42	6	>99,9	+72,9
M2B2	24	10	53	9	>99,9	+75,2
Isooctane	23	18	30	7	>99,9	+76,6

(a) : Excès énantiomériques obtenus par chromatographie en phase gazeuse.

Tableau 35 : Rendements et excès énantiomériques obtenu lors de la résolution du diol par la lipase B de *Candida antarctica*

Pour tous les solvants testés, les taux de conversion en monoacétate de configuration (1*R*,2*R*) varient entre 10 et 18%, avec une meilleure conversion obtenue dans le THF. Les meilleurs excès énantiomériques en monoacétate (**18a**) sont obtenus dans le M2B2, avec un excès maximal de 53%.

Les rendements en diacétates (**17b**) sont beaucoup plus faibles, avec un taux de conversion compris entre 6 et 9 %. Pour tous les solvants testés, la lipase B de *Candida antarctica* est parfaitement sélective du composé (1*S*,2*R*) (**17b**).

La grande différence entre les excès énantiomériques obtenus pour le mono- ou le diacétate pourrait être due à des contraintes stériques. Les deux énantiomères du monoacétate (**18**) peuvent pénétrer dans le site actif de l'enzyme alors que seul l'un des deux diacétates peut rentrer dans le site actif de l'enzyme.

La principale limitation de cette réaction est la faible quantité de diacétate énantiopur formé. Pour augmenter la quantité de produit formé, nous avons décidé d'augmenter la température du milieu réactionnel.

2. Résolution du diol racémique par acétylation énantiosélective en présence de la lipase B de *Candida antarctica* à 50°C

Du résultat précédent, le THF est le solvant qui a permis la meilleure conversion en monoacétate (**18**). Afin d'augmenter la quantité de produit formé, nous avons envisagé d'augmenter la température à 50°C pour diminuer les temps réactionnels (Schéma 118).

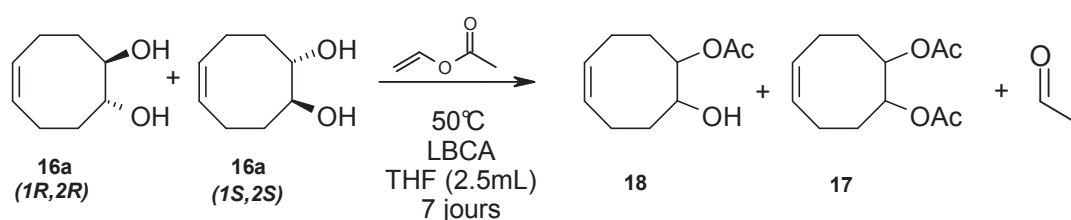


Schéma 118 : Résolution des diols *meso* par acétylation énantiosélective en utilisant la lipase B de *Candida antarctica*

Les taux de conversion et excès énantiomériques obtenus à 50°C ont été comparés dans le THF avec les valeurs précédemment obtenues à 35°C (Tableau 35).

Température (°C)	Temps (jour)	18b		17a	
		Rdt. (%)	ee (%) ^(a)	Rdt. (%)	ee (%) ^(a)
35	22	28	42	6	>99,9
50	7	30	50	20	>99,9

(a) : Excès énantiomériques obtenus par chromatographie en phase gazeuse.

Tableau 36 : Rendements et excès énantiomériques des mono- et di acétates obtenus par acétylation des diols *meso* par utilisation la lipase B de *Candida antarctica*

En augmentant la température de seulement 15°C, une bien meilleure conversion du diacétate (**17a**) est obtenu. Le rendement est augmenté d'un facteur 3,3, tout en conservant une énantiosélectivité totale de la lipase B de *Candida antarctica*.

Le rendement en mono acétate retrouvé pour les deux températures est similaire, avec un meilleur excès énantiomérique de la lipase à 50°C.

Dans cette réaction, on observe ici un rôle activateur de la température sur la lipase. L'augmentation de la température se traduit par un accroissement de l'activité de l'enzyme, sans pour autant nuire à sa sélectivité. Il sera nécessaire, dans les réactions futures d'étudier cette résolution enzymatique à plus haute température.

Pour accélérer encore la réaction enzymatique, l'irradiation micro-onde a été utilisée comme mode de chauffage.

3. Acétylation du diol homochiral sous irradiation micro-onde

D'après les précédentes expérimentations réalisées sous irradiation micro-onde, les capacités de la lipase sont exacerbées sous micro-onde. Nous avons donc décidé d'optimiser cette résolution par acétylation à court terme, sous irradiation micro-onde système ouvert (Schéma 119).

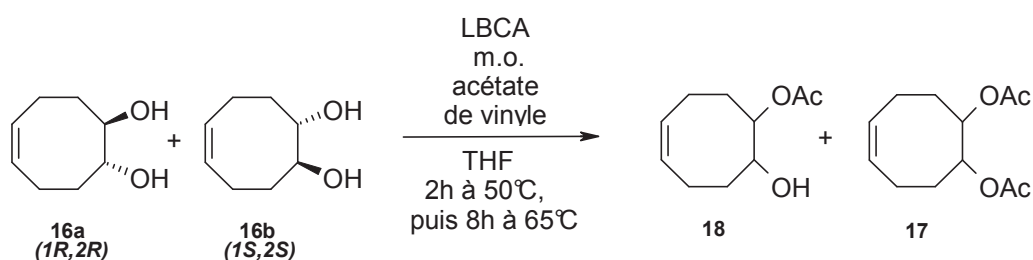


Schéma 119 : Résolution du diol homochiral par acétylation énantiosélective sous irradiation micro-onde

Le mélange réactionnel a été irradié pendant deux heures à 50°C, mais le suivi sur plaque CCM ne nous a pas permis d'observer de produit formé (**17** ou **18**). La réaction a donc été prolongée 8 heures à 65°C (Tableau 36).

18b		17a	
Rdt. (%)	ee (%) ^(a)	Rdt. (%)	ee (%) ^(a)
8,5	42	2,5	>99,9

(a) : Excès énantiomériques obtenus par chromatographie en phase gazeuse.

Tableau 37 : Résultats observés lors de l'acétylation du diol homochiral sous irradiation micro-onde

Bien que les rendements retrouvés soient très faibles (8.5% pour le monoacétate et seulement 2.5% de diacétate), l'énantiopréférence de la lipase de *Candida antarctica* n'est pas modifiée sous irradiation micro-onde. La sélectivité est toujours totale pour le diacétate de configuration (1*R*,2*R*), et partielle pour le monoacétate de configuration (1*S*,2*S*).

Cependant, l'utilisation de l'irradiation micro-onde ne semble, dans cette réaction modèle pas augmenter efficacement les paramètres intrinsèques de la lipase B de *Candida antarctica*. Même durant une faible durée d'irradiation, nous nous attendions à l'obtention d'une plus grande quantité de produit.

Par acétylation énantiosélective en présence de la lipase B de *Candida antarctica*, nous avons obtenu, dans le THF, un rendement satisfaisant de diacétate de configuration (1*S*,2*S*) avec un parfait contrôle de la sélectivité enzymatique. Ce résultat a été comparé avec l'utilisation de la lipase de *Pseudomonas cepacia* comme catalyseur.

4. Résolution du diol racémique par acétylation énantiosélective en présence de *Pseudomonas cepacia*

D'après les travaux précédemment effectués au laboratoire par E .Deau, la lipase de *Pseudomonas cepacia* est un enzyme non sélectif pour la désymétrisation des diols par acétylation en milieu non-conventionnel (Schéma 120).

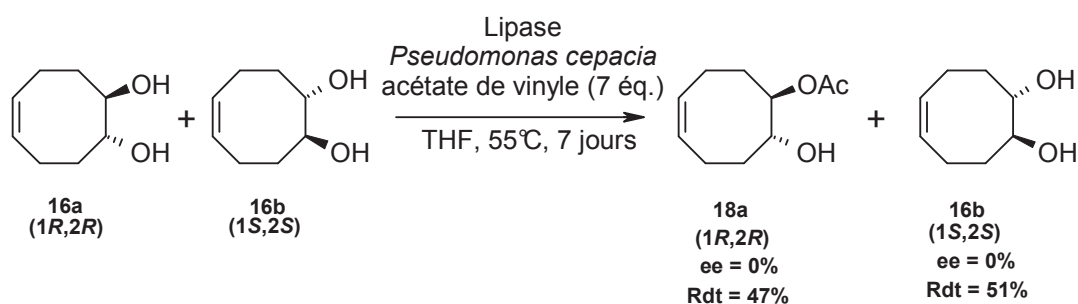


Schéma 120 : Utilisation de la lipase de *Pseudomonas cepacia* pour l'acétylation énantiosélective du diol méso

En effet, après une semaine de chauffage à 55°C en milieu non-conventionnel, la lipase de *Pseudomonas cepacia*, bien qu'ayant une bonne activité, n'a aucune sélectivité vis-à-vis des diols (**16**), les excès énantiomériques de monoacétate étant nuls.

La nouvelle stratégie en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* se révèle donc être une très bonne alternative pour l'obtention du diacétate (**17**) parfaitement énantiorésolu.

Afin d'obtenir l'énantiomère de configuration (1*R*,2*R*) et d'étudier l'hydrolyse sélective du diol protégé, nous avons envisagé une seconde voie de résolution enzymatique, par hydrolyse du diacétate.

3. Etude de la résolution des diols homochiraux par hydrolyse énantiosélective

1. Résolution des diols par utilisation hydrolyse en utilisant la lipase B de *Candida antarctica*

Poursuivant nos recherches sur la résolution de précurseurs diols homochiraux par la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée, nous nous sommes intéressés à la réaction d'hydrolyse du composé diacétate (**17**). En conditions d'hydrolyse, la réaction a été conduite en tampon phosphate 0.1M pH 7,0, à 30°C pendant 4 jours (Schéma 121).

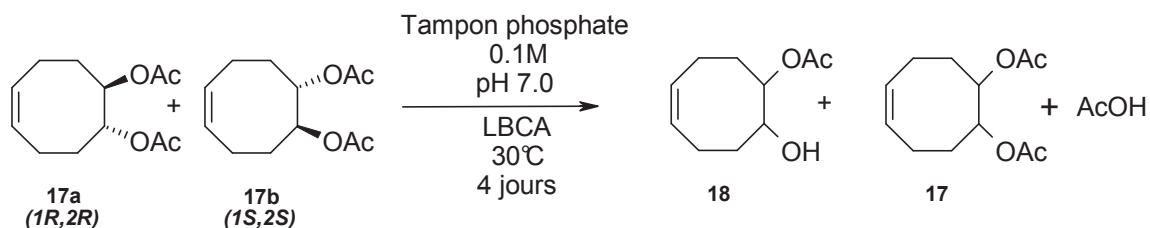


Schéma 121 Résolution des diols par hydrolyse en utilisant la lipase de *Pseudomonas cepacia*

Après 4 jours d'agitation, les taux de conversion et sélectivités enzymatiques ont alors été analysés (Tableau 38).

18b	16a		
Rdt. (%)	ee (%)^(a)	Rdt. (%)	ee (%)
17	67	26	3

(a) : Excès énantiomériques obtenus par chromatographie en phase gazeuse

Tableau 38 : Résolution du diacétate (17) par hydrolyse énantiosélective

La lipase B de *Candida antarctica* est sélective pour la formation du monoacétate de configuration (1*S*,2*S*). Ce mono acétate (**18b**) est obtenu avec un rendement de 17% mais avec un excès énantiomérique très insatisfaisant (67%).

Afin d'obtenir une résolution plus efficace, nous avons décidé de changer de lipase et de travailler en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacia*.

2. Résolution des diols par utilisation de la lipase de *Pseudomonas cepacia*

Déjà réalisée au sein du laboratoire ou dans la littérature, la résolution des diacétates est réalisable par utilisation de la lipase de *Pseudomonas cepacia*, en milieu biphasique²¹². L'hydrolyse énantiosélective du diester racémique a été réalisée à une température de 30°C, au sein d'un tampon phosphate à pH 7. La forme libre de la lipase de *Pseudomonas cepacia* a été utilisée comme catalyseur (Schéma 122).

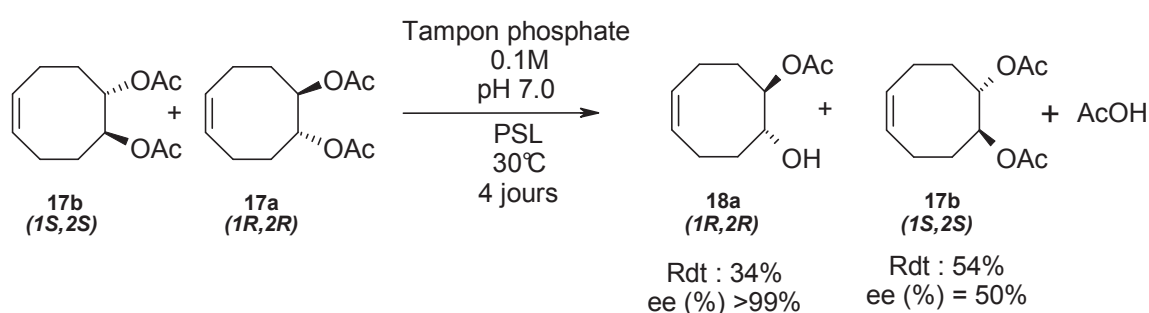


Schéma 122 : Résolution des diols par hydrolyse en utilisant la lipase de *Pseudomonas cepacia*

Après purification des produits réactionnels, la sélectivité de la lipase de *Pseudomonas cepacia* s'est avérée totale pour le mono ester de configuration (1R,2R), avec cependant un modeste rendement de 27 %.

Un rendement conséquent (54%) de diacétate est obtenu avec un excès énantiomérique modeste de 50%.

La lipase de *Pseudomonas cepacia* est capable d'hydrolyser sélectivement le diester de configuration (1S,2S), avec une sélectivité totale. Cependant, après les 4 jours de réaction, l'hydrolyse n'est pas complète, nous laissant présager d'une réaction réversible, l'acide acétique pouvant être réattaqué par le monoester.

Afin d'obtenir une quantité plus importante de monoester, une étape d'enrichissement à été réalisée au départ du diester énantiomériquement enrichi.

²¹² Horikawa T., Norimine Y., Tanaka M., Sakai K., Suemune H. Synthesis of Optically Active Bicyclo[3.3.0]octane Skeleton Using Transannular Reaction. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1998**, 46, 17-21.

3. Enrichissement enzymatique du diacétate (1*S*,2*S*) (17b)

Après purification, le diester énantiorenrichi (17b) a été resoumis à une hydrolyse énantiosélective de la lipase de *Pseudomonas cepacia*, dans les mêmes conditions que précédemment, pendant 15 jours (Schéma 123).

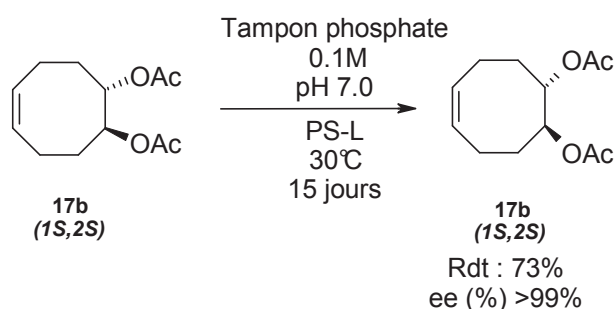


Schéma 123 : Enrichissement du diacétate par la lipase de *Pseudomonas cepacia*

Cette seconde hydrolyse conduit à la formation du diester (17b) avec un rendement de 73% et une sélectivité enzymatique totale.

4. Synthèse des diols (16a) et (16b) énantiopurs

Pour obtenir les deux diols homochiraux énantiomériquement purs, une saponification en conditions douces a été réalisée au départ du composé (18a) énantiopur, obtenu par acétylation énantiosélective en présence de la lipase B de *Candida antarctica*, et du composé (17b) énantiopur obtenu par hydrolyse énantiosélective en présence de la lipase de *Pseudomonas cepacia* (Schéma 124).

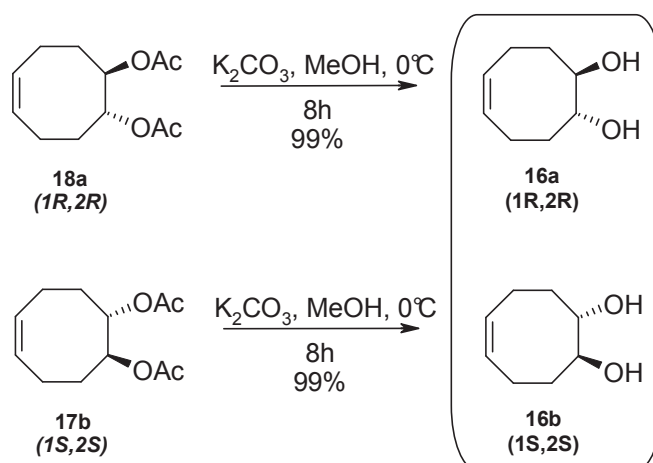
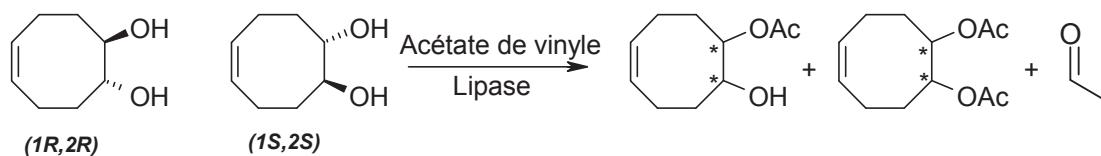


Schéma 124 : saponification des mono et diacétate pour obtenir les diols homochiraux cycliques

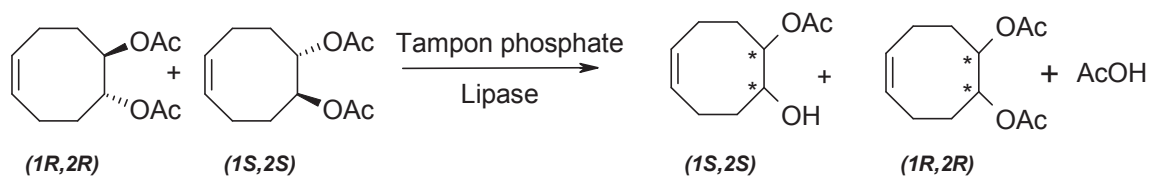
Au final, en prenant en compte les résolutions enzymatiques, le diol (**16a**) de configuration (*1R,2R*) est obtenu avec un rendement global de 12,5 % et le diol (**16b**) de configuration (*1S,2S*) avec un rendement global de 43% au départ du cycloocta-1,5-diène.

Conclusion sur la résolution des diols

La résolution des diols cycliques cyclo-octéniques a été réalisée par utilisation de deux voies de synthèse : par acétylation ou hydrolyse sélective (Schéma 125).



Résolution par acétylation



Résolution par hydrolyse

Schéma 125 : Différentes voies d'obtention pour la résolution des diols cycliques

Que se soit par acétylation énantiosélective ou par hydrolyse, les différentes lipases utilisées ne possèdent pas la même énantio-préférence.

Par acétylation en présence de la lipase B de *Candida antarctica*, seulement le diacétate (**17b**) de configuration (*1S,2S*) est observé. Par contre, par hydrolyse sélective du composé cyclique diacétylé, le diester (**17a**) est exclusivement retrouvé sous la configuration (*1R,2R*).

En choisissant judicieusement la lipase et les conditions opératoires, il est donc possible d'obtenir de façon totalement énantio-pure des composés (*1R,2R*) ou (*1S,2S*), précurseurs du jasmonate de méthyle.

La résolution efficace de diols étant possible en conditions classiques, nous nous sommes intéressés à la synthèse et la résolution enzymatique de composés plus complexes, les triols.

PARTIE II. Les triols : polypropionates complexes issus de la nature

I. Aspect bibliographique

Les polyols en général, et les triols en particuliers sont, dans la nature, issus de condensations intermoléculaires de sous unités acétiques ou propioniques. Ces composés polycondensés sont appelés polycétides (Schéma 126).

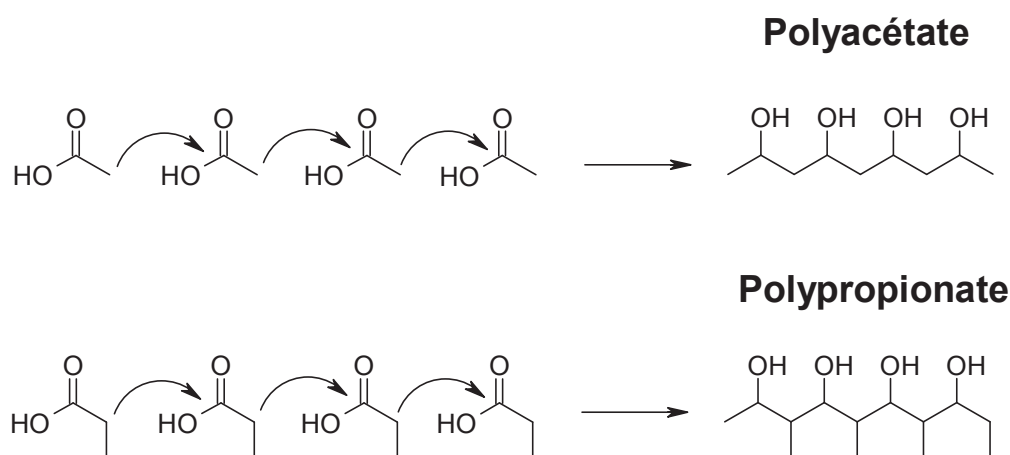


Schéma 126 : Formation des motifs polyacétates et polypropionates par condensation de l'acide acétique ou propionique

Regroupés en plusieurs familles, dont les polycétiques aromatiques, les spirocétales ou les macrolides, ces molécules sont retrouvées aussi bien dans le monde végétal qu'animal^{213,214}. Ils ont des propriétés biologiques diverses et sont utilisés comme antifongiques, antitumoraux, en passant par les antibactériens ou toxines^{215, 216, 217}.

Parmi les polycétides, les macrolides sont une famille de polycétiques, regroupant des molécules de taille importante, comportant souvent de nombreux motifs triols chiraux (Figure 28).

²¹³ Mancini I., Defant A., Guella G. Recent Synthesis of Marine Natural Products with Antibacterial Activities. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. **2007**, 6, 17-48.

²¹⁴ Tang Y., Lee T., Lee H., Khosla C. Exploring the biosynthetic potential of bimodular aromatic polyketide synthases. *Tetrahedron*. **2004**, 60, 7659-7671.

²¹⁵ Tardi P., Johnstone S., Harasym N., Xie S., Harasym T., Zisman N., Harvie P., Bermudes D., Mayer L. In vivo maintenance of synergistic cytarabine:daunorubicin ratios greatly enhances therapeutic efficacy. *Leukemia Research*. **2009**, 33, 129-139.

²¹⁶ Bister B., Bischoff D., Ströbele M., Riedlinger J., Reicke A., Wolter F., Bull A., Zähler H., Fiedler H.P., Süßmuth R. byssomicin C—A Polycyclic Antibiotic from a Marine Verrucospora Strain as an Inhibitor of the p-Aminobenzoic Acid/Tetrahydrofolate Biosynthesis Pathway. *Angewandte Chemie International Edition*. **2004**, 43, 2574-2576.

²¹⁷ Van Dolah F.M. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspective*. **2000**, 108, 133-141.

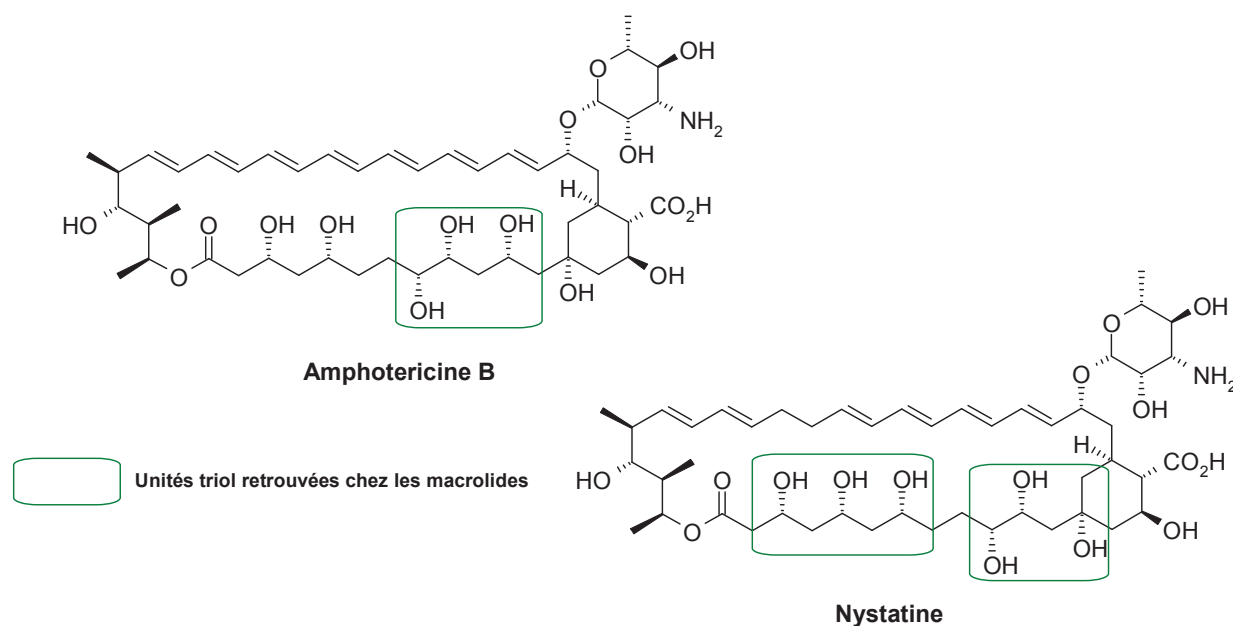


Figure 28 : Structure de quelques macrolides contenant des motifs triols

Leur synthèse chimique reste un véritable challenge pour le chimiste organicien du fait notamment du nombre important de centres asymétriques devant être contrôlés. Grâce à leur grande activité biologique de nombreux travaux font état de leur synthèse totale, ou de précurseurs dérivés^{218, 219}.

Poursuivant nos recherches concernant la synthèse et le dédoublement cinétique enzymatique de polyols, nous nous sommes intéressés à la synthèse puis la résolution de dérivés triols précurseurs de molécules d'intérêt biologique (Schéma 127).

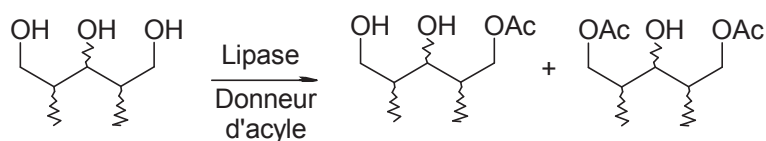


Schéma 127 : Résolution enzymatique de triols

La résolution de ces composés pourrait nous permettre d'obtenir de façon simple, rapide et efficace des dérivés tri-hydroxypentaniques résolus, à partir de triols prochiraux.

²¹⁸ Paterson I., Britton R., Delgado O., Gardner N., Meyer A., Naylor G., Poullennec K. Total synthesis of (–)-dictyostatin, a microtubule-stabilising anticancer macrolide of marine sponge origin. *Tetrahedron*. **2010**, 66, 6534–6545.

²¹⁹ Oh H.S., Kang H.Y. Total synthesis of neomethymycin and novamethymycin. *Tetrahedron*. **2010**, 66, 4307-4317.

II. Synthèse et résolution des triols

1. Synthèses des dérivés triols

La synthèse des dérivés triols est déjà connue dans la littérature²²⁰, elle comprend une synthèse chimique en 4 étapes.

1. Synthèse des esters éthyliques de l'acide 3-Hydroxy-2,4-diméthylpentanedioïque (19)

La première étape de la synthèse des triols consiste en une condensation de Reformatsky entre le 2-bromopropionate d'éthyle et le formate d'éthyle conduisant à la formation d'un mélange de diesters éthyliques (19) (Schéma 128).

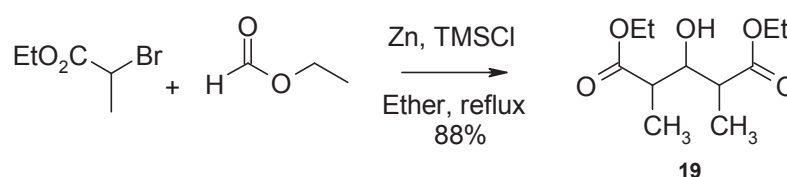


Schéma 128 : Synthèse d'un mélange de diastéréomères par condensation de Reformatsky

Cette réaction n'étant pas sélective, un mélange de 4 diastéréomères est obtenu (Tableau 39).

Diastéréomère	Rendement	nom
<i>Syn,syn</i>	41	(19a)
<i>d,l</i>	41	(19b)
<i>Anti,anti</i>	18	(19c)

Tableau 39 : Rendements obtenus pour chaque diastéréomère après réaction de Reformatsky

²²⁰ Domon L., Vogeleisen F., Uguen D. A convenient preparation of elements of the stereotriade. *Tetrahedron Letters*. 1996, 37, 2773-2776.

Les 4 diastéréomères inséparables sont retrouvés selon diverses proportions, avec une majorité de diester *syn,syn* et de mélange d'énantiomère *d,l* (**19a**).

2. Saponification des esters diéthyliques de 3-hydroxy-2,4-diméthylpentanedioïques

La séparation des esters éthyliques (**19**) n'est pas directement possible. La saponification de ces composés par une solution aqueuse de soude permet, après dix heures sous agitation à température ambiante, d'obtenir un mélange 4 :4 :1 des diastéréoisomères des acides 2,4-diméthyl-3-hydroxyglutariques (**20**) sous forme d'une huile semi-cristalline, avec un rendement de 91% (Schéma 129).

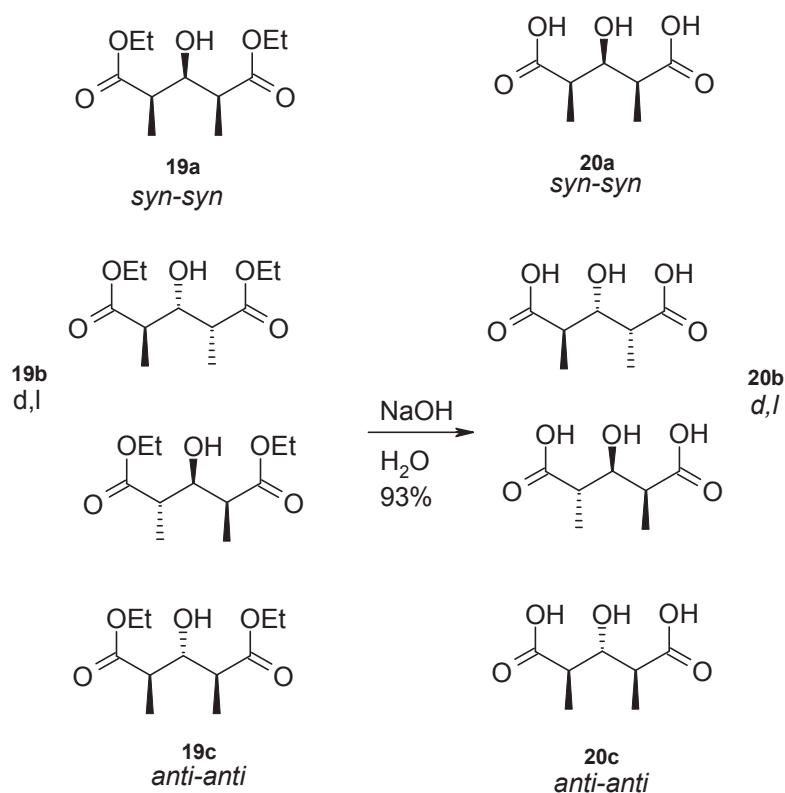


Schéma 129 : Saponification du mélange inséparable de diastéréomères.

L'huile obtenue cristallise par trituration dans de l'éther diéthylique anhydre. La recrystallisation de ces cristaux dans un mélange acétone/dichlorométhane : 4/6, permet l'obtention du diacide *syn,syn* (**20a**) pur.

La trituration des eaux mères en présence d'éther diisopropylique fournit des cristaux blancs riches en isomère *d,l* (**20b**). Après concentration des eaux mères de cette deuxième cristallisation, on récupère une huile riche en isomère *anti,anti* (**20c**).

3. Estérification du diacide *syn, syn* (**20a**)

Les diacides étant séparés, chaque diastéréomère est traité indépendamment. L'estérification du diacide *syn, syn* en présence de triméthylsilyl diazométhane dans un mélange éther diéthylique/méthanol à 0°C conduit à la formation du diester méthylique *syn, syn* (**21**) avec un rendement de 91% (Schéma 130).

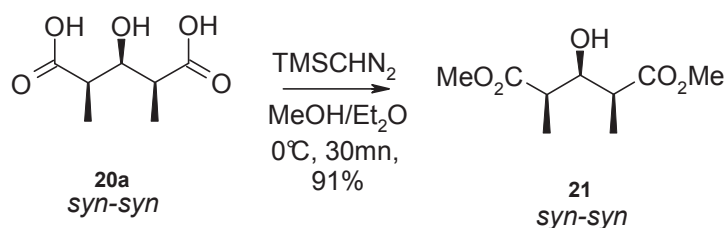


Schéma 130 : Estérification du diacide *syn, syn* en présence de triméthylsilyl diazométhane

4. Réduction du diester méthylique *syn, syn*

Afin d'accéder au triol *syn, syn*, une réduction des fonctions ester a été réalisée dans le tétraaluminohydrure de lithium, dans le THF, à 0°C pendant 3 heures. Le triol (**22**) est obtenu, après recristallisation dans un mélange acétone /DCM, avec un rendement satisfaisant de 80% (Schéma 131).

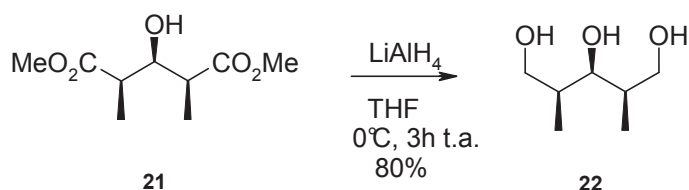


Schéma 131 : Réduction du diester méthylique *syn, syn* en triol *syn, syn*.

La synthèse du triol *syn,syn* étant réalisée, le dédoublement cinétique de ce prochiral a été envisagé par des lipases. Les triols *d,l* et *anti-anti* sont obtenus purs de la même manière, et seront résolus ultérieurement.

Dans la littérature²²³, la désymétrisation du triol *syn,syn* est réalisable par la lipase de *Pseudomonas fluorescens*, à température ambiante, avec l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle (Schéma 132).

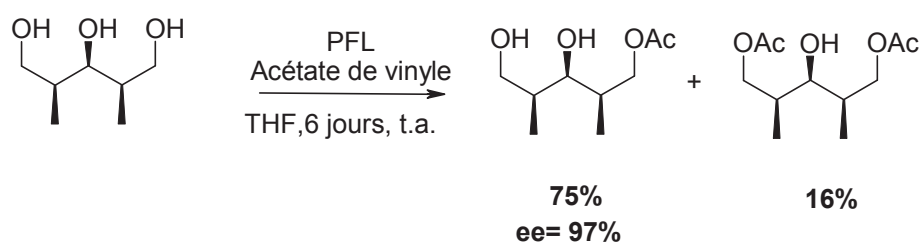


Schéma 132 : Acétylation stéréosélective du triol *syn,syn* par la lipase de *Pseudomonas fluorescens*

La lipase de *Pseudomonas fluorescens* est parfaitement sélective du triol. Un excellent rendement ainsi qu'une sélectivité quasi-totale sont observés.

Poursuivant nos recherches sur la compréhension de la sélectivité de la lipase de *Candida antarctica*, nous nous sommes intéressés à la résolution du triol *syn,syn* par acétylation énantiosélective en présence de cet enzyme.

2. Tentatives de résolution du triol *syn,syn* par utilisation de la lipase B de *Candida antarctica*

La résolution du triol *syn,syn* a été étudiée par acétylation sélective de la fonction alcool primaire du triol. Selon l'alcool primaire acétylé par la lipase, le triol prochiral pourra être résolu en énantiomère chiral (Schéma 133).

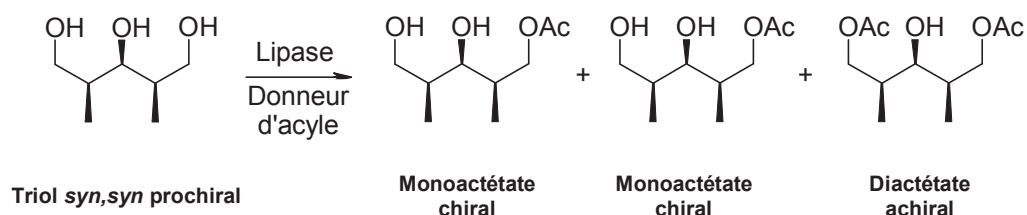


Schéma 133 : Estérification du triol *syn,syn* par une lipase

1. Résolution du triol en chauffage classique

Afin d'étudier la résolution du triol *syn,syn* (**22**), la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique a été étudiée. La réaction a été conduite en solvant aprotique apolaire : l'hexane et le THF, en conditions classiques, entre 0 et 35°C (Schéma 134).

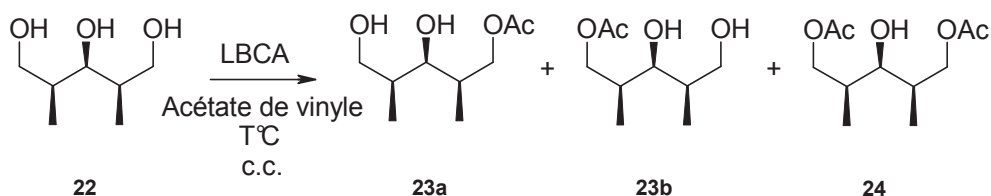


Schéma 134 : Acétylation du triol *syn,syn* par utilisation de la lipase B de *Candida antarctica*

Après réaction, entre 90 et 160 heures, et purification des composés, les excès énantiomériques sont déterminés (Tableau 40).

Entrée	Température	Solvant	Temps (h)	Mono acétate (23) (%)	$[\alpha]_D$ (20°C)	Di acétate (24) (%)
1	0°C	THF	160	21%	0° (C=4.2 in CH ₂ Cl ₂)	4
2	t.a.	Hexane	160	37%	-0.42° (c=2.7 in CH ₂ Cl ₂)	3
3	35°C	THF	90	<1%	-	27

Tableau 40 : Résolution du triol par acétylation dans l'hexane et le THF entre 0°C et 35°C

Le triol *syn,syn* (**22**) n'étant pas assez soluble dans l'hexane à 0°C, la réaction a dû être poursuivie à température ambiante.

Aux températures de 0°C et à t.a. (entrées 1 et 2) une meilleure monoacétylation du triol est observée, avec des rendements atteignant 37 % dans l'hexane, à température

ambiante. Cependant, pour ces deux solvants, aucune sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* n'est observée. Cette enzyme a donc un comportement complètement différent de la lipase de *Pseudomonas fluorescens*, qui dans ces conditions montrait une parfaite sélectivité pour le monoacétate.

Afin de mieux appréhender le comportement de la lipase B de *Candida antarctica*, la même réaction a été suivie à 35°C (entrée 3).

A cette température, le monoacétate formé n'est repéré que sous forme de traces. Le diacétate est purifié avec un rendement de 28% après 90 heures de réaction.

Pour observer l'évolution du comportement de la lipase B de *Candida antarctica*, la réaction a été envisagée sous irradiation micro-onde.

2. Résolution du triol *syn,syn* sous irradiation micro-onde

Etant donnée la mauvaise solubilité du triol dans l'hexane à basse température, la désymétrisation du triol *syn,syn* a été expérimentée sous irradiation micro-onde en système ouvert, en utilisant la lipase B de *Candida antarctica*, dans l'hexane, en faisant varier la température entre 35 et 100°C (Schéma 135).

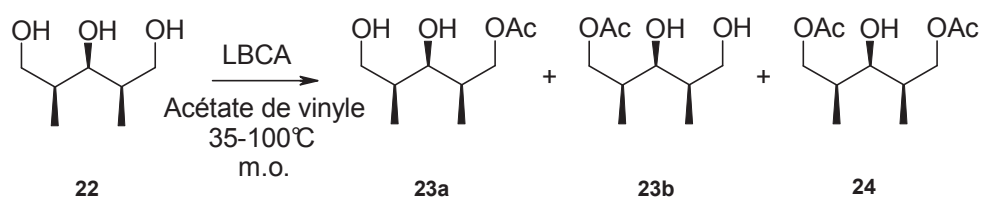


Schéma 135 : Résolution du triol *syn,syn* par acétylation sous irradiation micro-onde dans l'hexane entre 35°C et 100°C

Après une heure de réaction, le taux de conversion enzymatique a été calculé ainsi que les valeurs des pouvoirs rotatoires (Tableau 41).

Température	Mono acétate (23) (%)	[α]D (20°C)	Di acétate (24) (%)
35°C	4%	0° (c = 4.2, CH ₂ Cl ₂)	21
60°C	-	-	55
100°C	-	-	35

Tableau 41 Résolution du triol *syn,syn* sous irradiation micro-onde

Une augmentation de la conversion en diacétate (24) formé est observée par l'élévation de la température, avec un optimum retrouvé à 60 °C, avec 55% de rendement.

A 35°C, une faible proportion de monoacétate est obtenue, avec, comme en chauffage classique, une sélectivité nulle.

A 60°C et 100°C, aucune trace de monoacétate n'est retrouvée. Les rendements en composé diestérifié sont quant à eux satisfaisants.

Ces résultats corroborent donc ceux retrouvés en chauffage classique, l'irradiation micro-onde ne permet pas ici une meilleure conversion du triol en monoacétate ou une meilleure sélectivité.

La lipase B de *Candida antarctica* n'est pas sélective pour la formation du monoester (23), contrairement à la lipase de *Pseudomonas fluorescens*.

Afin de lever le doute concernant le rôle de l'alcool secondaire sur la résolution, nous avons envisagé une nouvelle approche concernant la résolution du triol, mais cette fois avec sa fonction alcool secondaire protégée.

3. Synthèse et résolution du triol *syn,syn* monoprotégé

Le triol *syn,syn* monoprotégé est obtenu en deux étapes au départ du diester méthylique (21a). Le diester méthylique monoprotégé est obtenu en présence de triflate de *tert*-butyldiméthylsilyle, et de 2,6-lutidine, dans le dichlorométhane. Après réduction du composé (25) en présence de tétraborohydrure de sodium dans un mélange THF/ethanol, le triol monoprotégé *syn,syn* (26) est obtenu avec un rendement de 82% (Schéma 136).

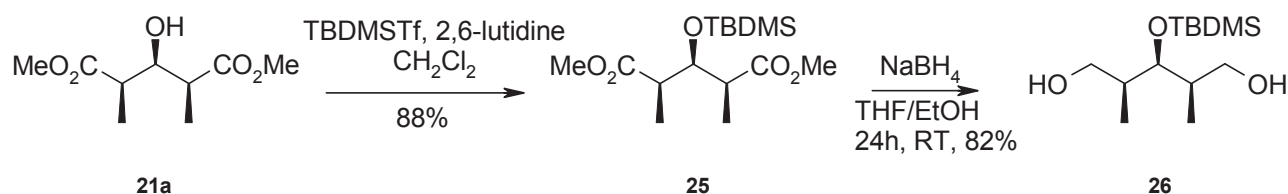


Schéma 136 : Monoprotection et réduction du triol *syn,syn*

4. Résolution du triol monoprotégé *syn,syn* par la lipase B de *Candida antarctica*

L'acétylation du triol *syn,syn* monoprotégé a été tentée en utilisant la lipase B de *Candida antarctica*, dans l'hexane, pendant 96 heures, en conditions classiques (Schéma 137).

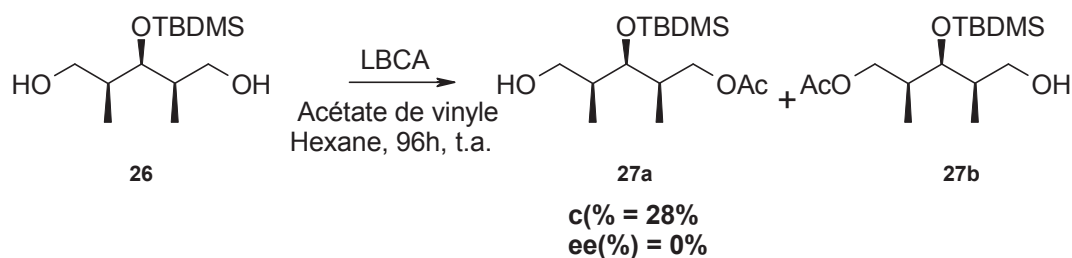


Schéma 137 : Tentative de résolution du triol *syn,syn* mono-protégé par utilisation de la lipase B de *Candida antarctica*.

Le rendement en monoacétate est satisfaisant, avec un taux de conversion enzymatique de 28%. Cependant, aucune sélectivité du monoacétate n'est remarquée, ni la présence de composé diacétylé, même sous forme de trace. La monoprotection du triol influence donc bien le comportement enzymatique de la lipase B de *Candida antarctica*. Bien que la sélectivité du monoacétate soit identique avec ou sans protection de l'alcool secondaire, la présence de composé diacétylé est uniquement observée pour le triol non-protégé. L'encombrement stérique induit par le dérivé silylé pourrait empêcher l'entrée dans le site actif de la lipase du composé (26).

N'observant pas de sélectivité de la lipase B de *Candida antarctica* pour la résolution du triol monoprotégé *syn,syn* ou non, nous avons envisagé une nouvelle voie de résolution, au départ du diacide *syn,syn* (20a).

5. Synthèse et résolution de diacides prochiraux

Dans la littérature, la résolution cinétique d'un diacide monoprotégé chiral a été réalisée par estérification dans l'éthanol, en utilisant la lipase B de *Candida antarctica* (Schéma 138)²²¹.

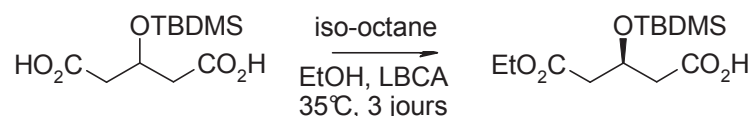


Schéma 138 : Résolution du diacide monoprotégé par utilisation de la lipase B de *Candida antarctica*

Dans ces conditions, le monoester est obtenu avec un rendement de 93% et un excès énantiomérique de 98%.

S'inspirant de cette étude, nous avons envisagé d'utiliser le précurseur diacide *syn, syn* (**20a**) comme substrat pour l'enzyme.

6. Synthèse du diacide *syn, syn* monoprotégé par saponification

Le diacide *syn, syn* monoprotégé (**28**), est obtenu par saponification, dans une solution méthanolique de soude, du composé (**25**), avec un rendement de 78% (Schéma 139).

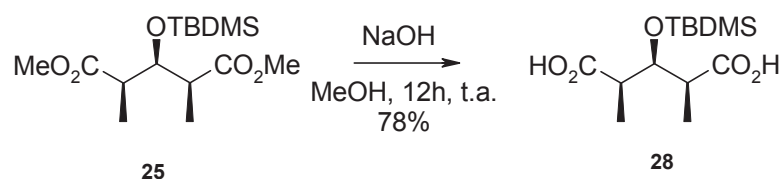


Schéma 139 : Saponification du diester monoprotégé *syn, syn*

²²¹ Wang B., Liu J., Tang X., Cheng C., Gu J., Dai L., Yu H. Enzymatic synthesis of (*S*)-glutaric acid monoesters aided by molecular docking. *Tetrahedron Letters*. **2010**, 51, 309-312.

7. Tentatives de résolution du diacide *syn,syn* par la lipase B de *Candida antarctica*

La résolution du diacide *syn,syn* monoprotégé ou non protégé a été comparée en présence de la lipase B de *Candida antarctica*, à 35°C en chauffage classique ou sous irradiation micro-onde, dans l'iso-octane ou dans l'éthanol (Schéma 140).

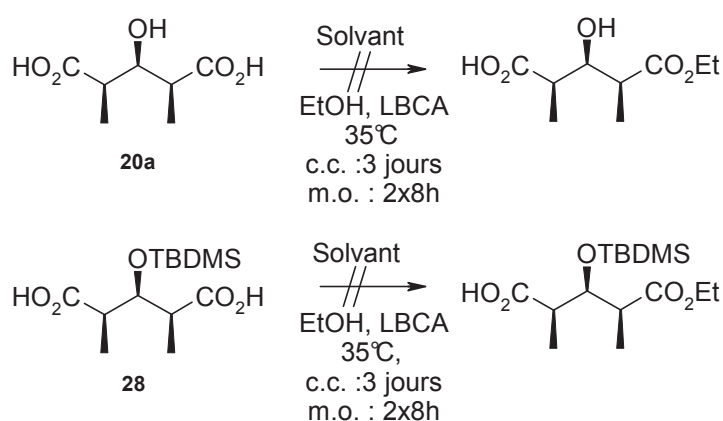


Schéma 140 : Tentatives de résolution du diacide *syn,syn* ou monoprotégé par la lipase B de *Candida antarctica*

Dans les solvants testés, aucune trace de produit n'est repérée, que se soit par chauffage classique ou sous irradiation micro-onde (2x8heures).

La même réaction a été tentée sous irradiation micro-onde en système ouvert. Cependant, aucun produit n'est formé, les produits (20a) et (28) sont retrouvés quantitativement.

La mono acétylation du diacide *syn,syn* protégé ou non est donc pas réalisable par la lipase B de *Candida antarctica*, quelles que soient les conditions envisagées.

Ce manque total d'activité enzymatique vis-à-vis de son substrat pourrait s'expliquer par des gênes stériques provoquées par les groupements méthyles présents chez le diacide *syn,syn* (20a) mais absents chez la molécule de la littérature (Schéma 141).

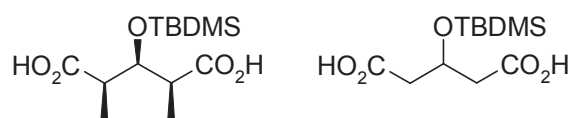


Schéma 141 : Comparaison structurale entre le diacide synthétisé et le diacide issu de la littérature

Afin de mieux comprendre ce phénomène de gêne stérique, une étude de modélisation moléculaire pourrait être utile.

Cette étude nous a montré que la lipase B de *Candida antarctica* n'est pas un enzyme qui nous a permis la résolution efficace des triols *syn,syn*. Pour continuer nos recherches sur la résolution de ce composé, une nouvelle enzyme a été étudiée, la cutinase, qui est une hydrolase sélective des alcools primaires.

3. Résolution du triol par la cutinase

La cutinase est un enzyme extracellulaire excrété par des champignons phytopathogènes. La cutinase est une hydrolase (EC 3.1.1.74) qui nativement dégrade la cutine, polymère lipidique présent dans les couches épidermiques des végétaux²²².

Chimiquement, la cutinase de *Fusarium solani pisi* a été utilisée dans la résolution de composés polyols primaires et secondaires (Schéma 142)²²³.

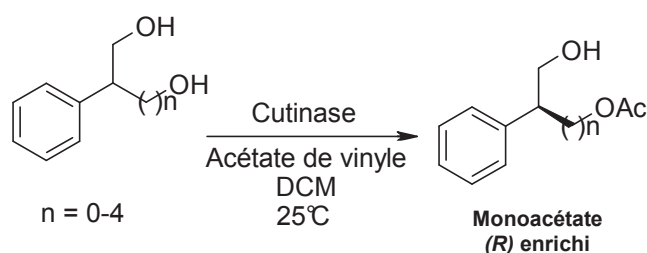


Schéma 142 : Acétylation d'un diol par la cutinase

²²² Pollard M., Beisson F., Li Y., Ohlrogge J. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science*. **2008**, 13, 236-246.

²²³ Borreguero I., Carvalho C., Cabral J., Sinisterra J., Alcántara A. Enantioselective properties of *Fusarium solani pisi* cutinase on transesterification of acyclic diols: activity and stability evaluation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2001**, 11, 613-622.

S'inspirant de ces travaux, nous nous sommes intéressés à la résolution du triol en utilisant une cutinase synthétisée par l'équipe du Professeur K. Hult au KTH de Stockholm.

La résolution du triol *syn,syn* (**22**) a été étudiée en présence de 5 mg de cutinase, à t.a. ou à 4°C, dans le dichlorométhane en utilisant l'acétate de vinyle comme donneur d'acyle (Schéma 143).

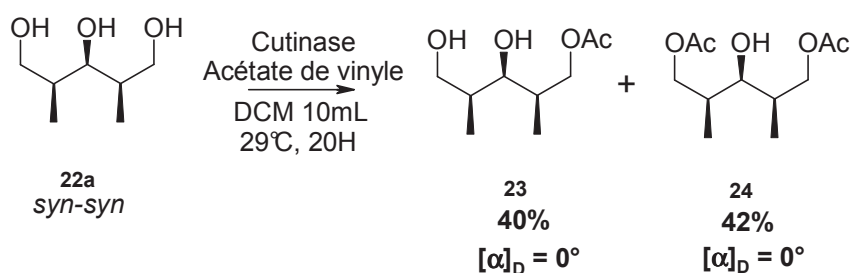


Schéma 143 : Résolution du triol *syn,syn* par la cutinase

En conditions classiques, la cutinase est un enzyme très actif. Les rendements obtenus après purification sont très satisfaisants, avec 40% de produit monoestérifié et 42 % de diacétate.

Malgré la faible sélectivité de la cutinase dans l'acétylation du triol, cet enzyme est très encourageant, car très actif. Il faudra, comme perspective future essayer d'augmenter la sélectivité de la cutinase, en abaissant la température de réaction, qui pourrait être couplée à l'irradiation micro-onde, et tester cette résolution avec le triol *syn,syn* monoprotégé.

Conclusion

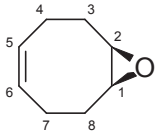
Les lipases de *Pseudomonas cepacia* et de *Candida antarctica* sont toutes les deux capables de résoudre efficacement un mélange racémique de diols cycliques homochiraux. Leur grande sélectivité (dans l'hydrolyse pour *Pseudomonas cepacia* et l'acétylation pour *C. antarctica*) en font des enzymes de choix dans la synthèse de précurseurs chiraux du jasmonate de méthyle. Lors de cette étude, il a été possible de synthétiser de manière totalement sélective les diols homochiraux de configuration (*1R,2R*) et (*1S,2S*).

Dans le cadre de la résolution de ces diols, l'activité micro-onde n'a cependant pas d'effet activateur des enzymes.

Dans le prolongement de cette étude, nous nous sommes intéressés à la résolution de composés linéaires polyhydroxylés : les triols. Ces précurseurs prochiraux sont d'un grand intérêt dans la synthèse de polycétides. Après obtention des dérivés triols protégés ou non, leur résolution par la lipase B de *Candida antarctica* s'est révélée impossible, des encombrements stériques peuvent conduire à la non-activité/sélectivité de la lipase. Les essais actuellement menés sur cutinase montrent une sélectivité toute autre, avec de très bons rendements obtenus au détriment de la sélectivité.

PARTIE EXPERIMENTALE

(Z)-(1S,2R)-9-oxa-bicyclo[6.1.0]non-4-ène (15)

	<p>C₈H₁₂O MM : 124,180 g.mol⁻¹ Huile incolore Rdt : 67%</p>
---	--

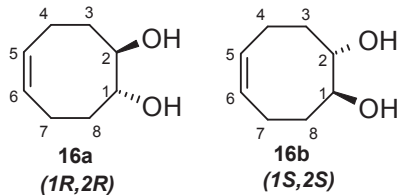
Sous atmosphère inerte d'argon, à une solution de cycloocta-1,5-diène (20,0g, 0,161 mol) et de carbonate de sodium (117,642g, 1,11 mol) dans le dichlorométhane (560 mL) maintenue à 0°C est additionnée goutte à goutte une solution d'acide peracétique (39% vol., 42,7 mL, 0,222 mol) dans le dichlorométhane anhydre pendant 2 heures. Le mélange est agité pendant 8 heures à 0°C, puis pendant 12 heures à température ambiante. Le brut réactionnel est ensuite lavé à l'eau et extrait au dichlorométhane (3 x 250 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (200 mL) puis séchées sur sulfate de magnésium, et évaporées sous vide. Le résidu huileux incolore est purifié par colonne chromatographique (EP/AcOEt : 9/1). Le *méso*-époxyde (15) (5,697 g, 45,9mmol) est obtenu avec un rendement de 67%.

ν (cm⁻¹): 3003, 2906, 2887, 1655, 1445, 1428, 1228, 1669, 1099, 1039, 934, 762, 743.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm): 5,56–5,60 (m, 2H, H4 et H5); 3,00–3,02 (m, 2H, H1 et H8); 2,41–2,47 (m, 2H, CH2); 1,98–2,17 (m, 4H, CH2).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm): 128,6 (C4 et C5); 56,2 (C1 et C8); 27,8 (C2 et C7); 23,4 (C3 et C6).

(±)-(Z)- cyclooct-5-ène-1,2-diol (16)

 <p>16a (1R,2R)</p> <p>16b (1S,2S)</p>	<p>$C_8H_{14}O_2$ MM : 142,196 g.mol⁻¹ Huile incolore Rdt : 57%</p>
---	---

Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte d'argon, au *méso*-époxyde (**15**) (5,697g, 45,9mmol) vigoureusement agité à température ambiante est ajoutée une solution aqueuse d'acide sulfurique 2M (25,3 mL, 50,47 mmol, 1,1éq.). Après 4 heures sous agitation, le mélange réactionnel est extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 75 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées successivement avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (40 mL), de saumure (40 mL); elles sont enfin séchées sur sulfate de magnésium et évaporées sous vide. Le résidu huileux incolore est purifié par colonne chromatographique (EP/AcOEt : 6/4). Le diol racémique (**16**) (3,691g, 101,7 mmol) est obtenu avec un rendement de 57%.

ν (cm⁻¹): 3362, 3014, 2964, 2861, 1651, 1427, 1429, 1400, 1271, 1202, 1010, 994, 976, 947, 868, 732, 719.

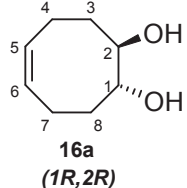
¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm): 5,56–5,64 (m, 2H, **H5** et **H6**); 3,64–3,71 (m, 2H, **H1** et **H2**); 2,61 (s large, 2H, **OH**); 2,30–2,40 (m, 2H, **CH**₂); 2,08–2,19 (m, 2H, **CH**₂); 1,55–1,63 (m, 2H, **CH**₂).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm): 129,3 (**C5** et **C6**); 73,9 (**C1** et **C2**); 33,4 (**C3** et **C8**); 22,7 (**C4** et **C7**).

Hydrolyse sélective du diacétate (17) par la lipase B de *Candida antarctica* (METHODE R)

Sous atmosphère inerte d'argon, à une émulsion thermostatée à 30°C de diacétate (0,2 g, 0,884 mmol) dans un tampon phosphate (2,6 ml) à 0,1 M et pH=7 est ajoutée la lipase *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (0,94 mg). Le mélange est agité pendant 96 heures. Le brut dilué ensuite avec une solution de saumure (1,1 ml) est extrait trois fois à l'acétate d'éthyle (3 x 2,7 ml). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (1,6 ml) puis de saumure. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur sulfate de magnésium, filtrées, concentrées sous vide partiel. Le résidu huileux purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt : 9/1) permet d'isoler le monoacétate (**18b**) du diol restant (**16a**).

(1R,2R)-(Z)- Cyclooct-5-ène-1,2-diol (16a)

 <p>16a (1R,2R)</p>	<p>$C_8H_{14}O_2$ MM : 142,196 g.mol⁻¹ Huile incolore</p>
---	---

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
R	t.a.	26	3

Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte d'argon, à une solution d'hydroxyester énantio pur (**18a**) (3,185 g, 17,3 mmol) dans le méthanol (10 mL) est ajouté le carbonate de potassium anhydre (119 mg, 0,86 mmol). Le mélange est agité pendant 8 heures à 0°C. Le brut réactionnel est acidifié avec une solution aqueuse 1M d'acide chlorhydrique (10 mL). La phase aqueuse est

extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 80 mL). Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium (50 mL); puis de saumure (50 mL); séchées sur sulfate de magnésium, filtrées, et concentrées sous vide partiel. Le résidu huileux purifié par chromatographie (EP/AcOEt : 6/4) permet d'isoler le diol énantiopur (**16a**) (2,43 g, 17,1 mmol) avec un rendement de 99%.

$[\alpha]_D$: -20,9° (c = 1,00 CHCl₃)

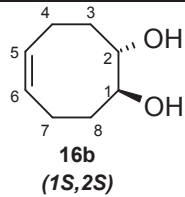
Conditions HPLC *n*-heptane/EtOH: 9/1, débit: 1 mL.min⁻¹, P_{moy.} = 380 psi, P_{max.} = 420 psi, *tr*: 8,80 min.

ν (cm⁻¹): 3362, 3014, 2964, 2861, 1651, 1427, 1429, 1400, 1271, 1202, 1010, 994, 976, 947, 868, 732, 719.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 5,56–5,64 (m, 2H, **H5** et **H6**); 3,64–3,71 (m, 2H, **H1** et **H2**); 2,61 (s large, 2H, **OH**); 2,30–2,40 (m, 2H, **CH**₂); 2,08–2,19 (m, 2H, **CH**₂); 1,55–1,63 (m, 2H, **CH**₂).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm): 129,3 (**C5** et **C6**); 73,9 (**C1** et **C2**); 33,4 (**C3** et **C8**); 22,7 (**C4** et **C7**).

(1*S*,2*S*)-(Z)- Cyclooct-5-ène-1,2-diol (**16b**)

 <p>16b (1<i>S</i>,2<i>S</i>)</p>	<p>C₈H₁₄O₂ MM : 142,196 g.mol⁻¹ Huile incolore</p>
---	--

Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte d'argon, à une solution de diacétate énantiopur (**17b**) (3,185 g, 17,3 mmol, 1 éq.) dans le méthanol (10 mL) est ajouté le carbonate de potassium anhydre (119 mg, 0,86 mmol, 0,05 éq.). Le mélange est agité pendant 8 heures à 0°C. Le brut

réactionnel est acidifié avec une solution aqueuse 1M d'acide chlorhydrique (10 mL). La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 80 mL); les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (50 mL); puis de saumure (50 mL); et enfin séchées sur sulfate de magnésium, filtrées, et concentrées sous vide. Le résidu huileux purifié par chromatographie sur gel de silice (EP/AcOEt : 6/4) permet d'isoler le diol énantiopur (**16b**) (2,43 g, 17,1 mmol) avec un rendement de 99%.

$[\alpha]_D : +18,2^\circ$ (c = 1,00 CHCl₃)

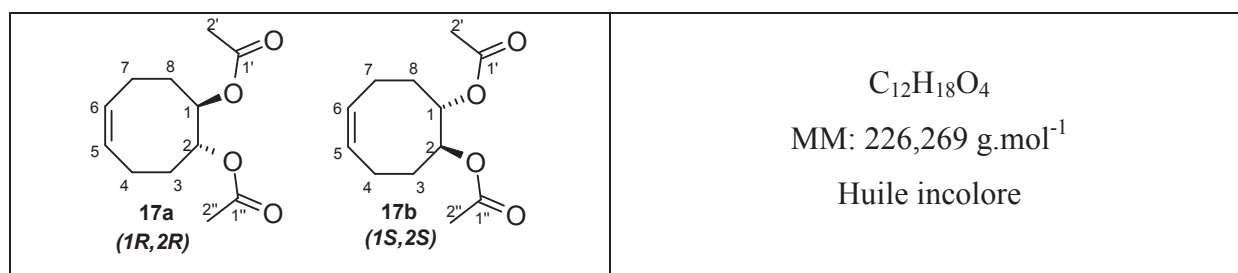
Conditions HPLC : *n*-heptane/EtOH : 9/1, débit : 1 mL.min⁻¹, P_{moy.} = 380 psi, P_{max.} = 420 psi, *tr* : 7,18 min.

ν (cm⁻¹): 3362, 3014, 2964, 2861, 1651, 1427, 1429, 1400, 1271, 1202, 1010, 994, 976, 947, 868, 732, 719.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm): 5,56–5,64 (m, 2H, **H5** et **H6**); 3,64–3,71 (m, 2H, **H1** et **H2**); 2,61 (s large, 2H, **OH**); 2,30–2,40 (m, 2H, **CH**₂); 2,08–2,19 (m, 2H, **CH**₂); 1,55–1,63 (m, 2H, **CH**₂).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm): 129,3 (**C5** et **C6**); 73,9 (**C1** et **C2**); 33,4 (**C3** et **C8**); 22,7 (**C4** et **C7**).

(±)-Acétate de (*Z*)-2-acétoxy-cyclooct-4-ényle (**17**)



Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte d'argon, à une solution du diol (**16**) (3,644g, 25,6 mmol, 1éq.) dans la pyridine (3,1 mL, 38,4mmol, 1,5éq.) maintenue à 0°C est additionné goutte à goutte

l'anhydride acétique (5,1 mL, 53,8 mmol, 2,1éq.). Le mélange réactionnel est agité pendant une heure à 0°C puis ramené à température ambiante et laissé sous agitation pendant 12 heures. Sont alors ajoutés successivement une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1M (40 mL) puis l'acétate d'éthyle (50 mL). La phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 40 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (25 mL), de saumure (25 mL) elles sont enfin séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées sous vide partiel. Le résidu huileux purifié par colonne chromatographique sur gel de silice, éluant : EP/AcOEt : 9/1, permet d'isoler le diacétate pur (**17**) (5,140 g, 22,72 mmol) avec un rendement de 89%.

Acétylation sélective du diol (16**) par la lipase B de *Pseudomonas cepacia* (METHODE S)**

Sous atmosphère inerte d'argon à une solution de diol racémique (**16**) (0,2 g, 1,406 mmol) solubilisé dans le THF (2,5 ml) sont additionnés l'acétate de vinyle (1,3 ml, 0,0136 mol) puis la lipase *Pseudomonas cepacia* sous forme libre. Le mélange est agité à une température de 55°C pendant 7 jours. Le brut réactionnel est ensuite filtré sur verre fritté, extrait à l'hexane (3 x 7 ml). Les phases organiques sont rassemblées puis lavées avec une solution à 5% d'HCl (3 ml), une solution saturée de d'hydrogénocarbonate de sodium (3 ml) et enfin de saumure. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée sous vide partiel. Le résidu huileux purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt : 6/4) permet d'isoler le monoacétate (**18**) le diacétate (**17**).

Hydrolyse sélective du diacétate (17**) par la lipase de *Pseudomonas cepacia* (METHODE T)**

Sous atmosphère inerte d'argon, à une émulsion thermostatée à 30°C du diacétate racémique (**17**) (5,140 g, 22,72 mmol) dans un tampon phosphate (70 mL) à 0,1M et pH = 7 est ajoutée la lipase de *Pseudomonas cepacia* (1,98 g). Le mélange est agité pendant 96 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est dilué avec une solution de saumure (30 mL) puis est extrait trois fois à l'acétate d'éthyle (3 x 70 mL). Les phases

organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (45 mL) puis de saumure (30 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée sous vide partiel. Le résidu huileux purifié par colonne chromatographique sur gel de silice avec comme éluant un mélange éluant : EP/AcOEt : 9/1, conduit dans l'ordre d'éluant, au diester énantiométrique (**17b**) puis à l'hydroxyester énantiométrique (**18a**).

Enrichissement du diacétate (**17b**)

A une émulsion thermostatée à 30°C du diacétate énantiométrique (**17b**) (5,035 g, 22,25 mmol) dans un tampon phosphate (130 mL) à 0,1M et pH = 7 est additionnée la lipase de *Pseudomonas Cepacia* (1,936 g, 87 mg/mmol de diester). Le mélange est agité pendant 15 jours. De la saumure (50 mL) est ajouté au tampon. La phase aqueuse est extraite trois fois à l'acétate d'éthyle (3 x 120 mL). Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (100 mL), de saumure (50 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées, concentrées sous vide partiel. Le résidu huileux purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt : 9/1) permet d'isoler le diester énantiométrique (**17a**) (3,680 g, 16,26 mmol) avec un rendement de 73%.

Acétylation sélective du diol (16**) par la lipase B de *Candida antarctica* (METHODE U)**

En chauffage classique :

Sous atmosphère inerte d'argon à une solution de diol racémique (**16**) (0,2 g, 1,406 mmol) solubilisé dans le solvant (THF, hexane, M2B2 ou isooctane, 2,5 ml) est additionnée l'acétate de vinyle (1,3 ml, 0,0136 mol); et la lipase *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (500 mg). Le mélange est agité à une température de 35°C ou 50°C pendant 7, 22, 23 ou 24 jours selon le solvant choisi. Le brut réactionnel est ensuite filtré sur verre fritté, extrait à l'hexane (3 x 7 ml). Les phases organiques sont rassemblées puis lavées avec une solution à 5% d'HCl (3 ml), puis avec une solution saturée de d'hydrogénocarbonate de sodium (3 ml) et enfin de saumure. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées sur vide partiel. Le résidu huileux purifié par

chromatographie sur gel de silice (éluant : EP/AcOEt : 6/4) permett d'isoler le monoacétate (**18b**) du diacétate (**17a**).

Sous irradiation micro-onde :

Sous atmosphère inerte d'argon à une solution de diol racémique (**16**) (0,2 g, 1,406 mmol) solubilisé dans le THF (2,5 ml) sont additionnés l'acétate de vinyle (1,3 ml, 0,0136 mol) et la lipase *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (500 mg). Le mélange est agité pendant 2h à 50°C, puis 8h à 65°C sous irradiation micro-onde. Le mélange est filtré et la phase aqueuse est extraite avec l'acétate d'éthyle (3 x 7 mL). Les phases organiques sont lavées avec une solution saturée de d'hydrogénocarbonate de sodium (3 ml) puis avec la saumure. La solution est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée sur vide partiel. Le résidu huileux purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant :EP/AcOEt : 6/4) permet d'isoler le monoacétate (**18b**) et le diacétate (**17a**).

Diacétate de (1R,2R)-(Z)-1-acétoxy-cyclooct-4-ényle (**17a**)

<p>17a (1R,2R)</p>	$C_{12}H_{18}O_4$ MM: 226,269 g.mol ⁻¹ Huile incolore
-------------------------------	--

Le produit est obtenu par la méthode U à 35°C.

Méthode	Rdt (%)	Ee (%)
U	20	100

$[\alpha]_D^{20}$: + 83,9° (C= 0,99, CHCl₃).

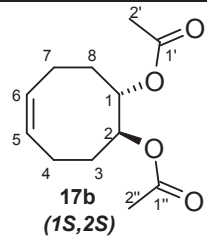
Conditions CPG : Température de la colonne durant l'analyse : 80°C : tr : 58,8 min

ν (cm^{-1}): 3016, 2938, 2866, 1732, 1654, 1431, 1370, 1226, 1244, 1032, 978, 946, 735, 722.

^1H RMN (400MHz, CDCl_3 , ppm): 5,64–5,66 (m, 2H, **H5** et **H6**); 5,11–5,13 (m, 2H, **H1** et **H2**); 2,40–2,47 (m, 2H, **CH**₂); 2,17–2,23 (m, 2H, **CH**₂); 2,04–2,07 (m, 2H, **CH**₂); 2,02 (s, 6H, **H2'** et **H2''**); 1,84–1,77 (m, 2H, **CH**₂).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3 , ppm): 170,2 (**C1'** et **C1''**); 128,9 (**C5** et **C6**); 73,8 (**C1** et **C2**); 30,1 (**C3** et **C8**); 22,9 (**C4** et **C7**); 21,0 (**C2'** et **C2''**).

Diacétate de (1*S*,2*S*)-(Z)-1-acétoxy-cyclooct-4-ényle (17b)

 <p>17b (1<i>S</i>,2<i>S</i>)</p>	<p>$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_4$ MM: 226,269 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Huile incolore</p>
--	---

Méthode	Rdt (%)	ee (%)
T	73	>99

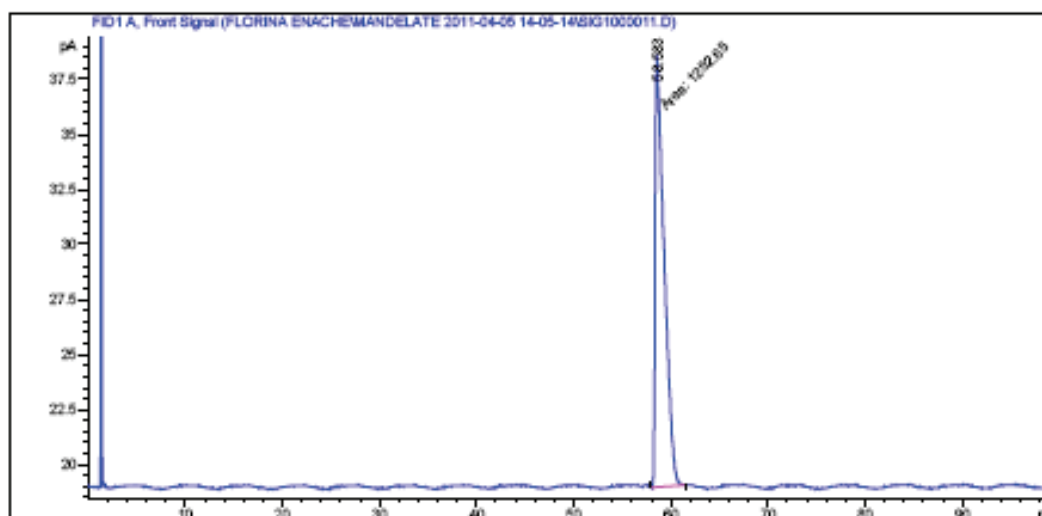
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: - 83,9° (C= 0,99, CHCl_3).

Conditions CPG : Température de la colonne durant l'analyse : 80°C : tr : 58,8 min

ν (cm^{-1}): 3016, 2938, 2866, 1732, 1654, 1431, 1370, 1226, 1244, 1032, 978, 946, 735, 722.

^1H RMN (400MHz, CDCl_3 , ppm): 5,64–5,66 (m, 2H, **H5** et **H6**); 5,11–5,13 (m, 2H, **H1** et **H2**); 2,40–2,47 (m, 2H, **CH**₂); 2,17–2,23 (m, 2H, **CH**₂); 2,04–2,07 (m, 2H, **CH**₂); 2,02 (s, 6H, **H2'** et **H2''**); 1,84–1,77 (m, 2H, **CH**₂).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3 , ppm): 170,2 (**C1'** et **C1''**); 128,9 (**C5** et **C6**); 73,8 (**C1** et **C2**); 30,1 (**C3** et **C8**); 22,9 (**C4** et **C7**); 21,0 (**C2'** et **C2''**).



Chromatogramme du (1*S*,2*S*)-Diacétate de (Z)-1-acétoxy-cyclooct-4-ényle

Acétate de (1*R*,2*R*)-(Z)-(1*R*,8*R*)-8-hydroxy-cyclooct-4-ényle (18a)

<p>(1<i>R</i>,2<i>R</i>)</p>	<p>$C_{10}H_{16}O_3$ MM : 184,237 g.mol⁻¹ Cristaux opaques Blancs</p>
------------------------------	---

Le produit est obtenu par la méthode T

Méthode	Rdt (%)	Ee (%)
T	34	>99

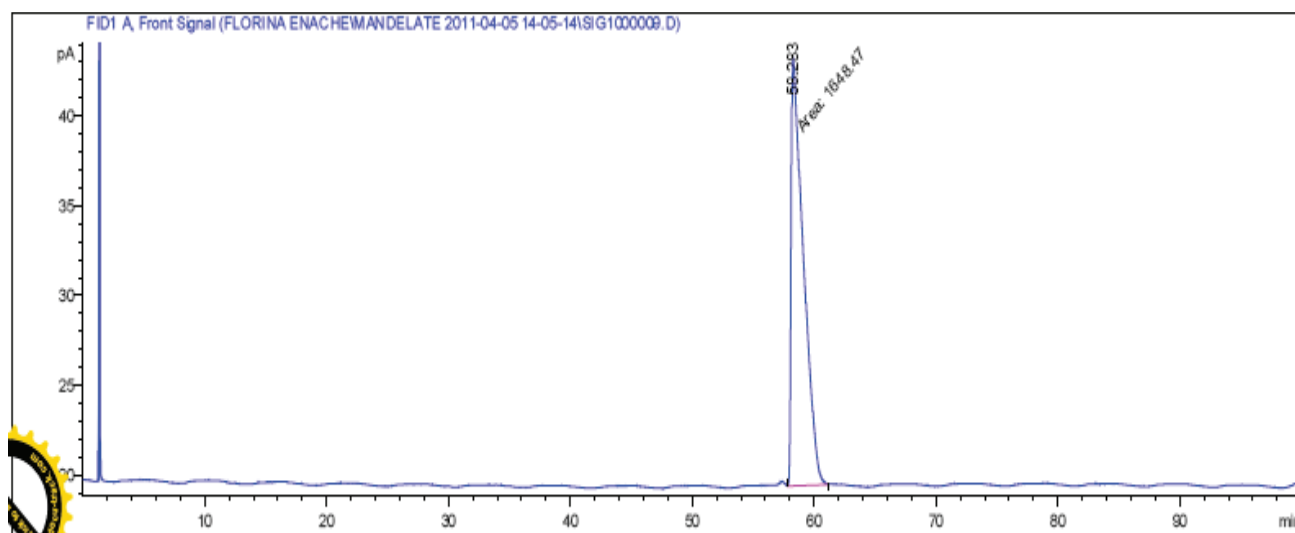
Conditions CPG: Température de la colonne durant l'analyse pendant 80min : 110°C, tr : 58,3 min

$[\alpha]_D^{20}$: -3,84° (C= 0,99, CHCl₃).

ν (cm⁻¹): 3449, 3012, 2936, 1717, 1654, 1430, 1235, 1030, 971, 933, 720.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm): 5,59–5,69 (m, 2H, H5, H6); 4,95 (dt, *J*=8,8 Hz, 4,0Hz, 1H, H2); 3,90 (dt, *J*=2,1 Hz, 1H, H1); 2,54 (s large, 1H, OH); 2,38–2,42 (m, 2H, CH₂); 2,04–2,25 (m, 7H, CH₂ et CH₃); 1,68–1,74 (m, 2H, CH₂).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3 , ppm): 170,7 (C1'); 129,5 (C5 ou C6); 128,6 (C5 ou C6); 77,2 (C2); 72,1 (C1); 32,7 (C8); 30,0 (C3); 22,8 (C4 ou C7); 22,8 (C4 ou C7); 21,2 (C2').



Chromatogramme du (1*R*,2*R*)-acétate de (Z)-(1*R*,8*R*)-8-hydroxy-cyclooct-4-ényle

Acétate de (1*S*,2*S*)-(Z)-(1*R*,8*R*)-8-hydroxy-cyclooct-4-ényle (18b)

<p>(1<i>S</i>,2<i>S</i>)</p>	<p>$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$ MM : 184,237 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Cristaux opaques blancs</p>
------------------------------	---

Le produit est obtenu par la méthode **U** ou **R**

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
U	35	30	50
R	65	17	67

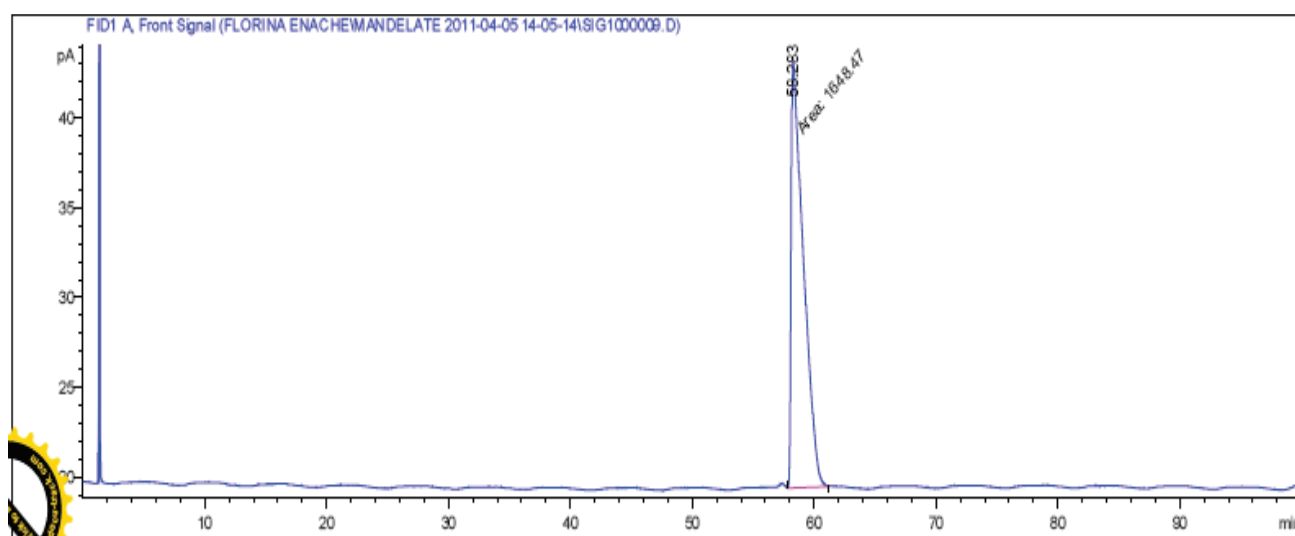
Conditions CPG: Température de la colonne durant l'analyse pendant 80min : 110°C, tr : 58,3 min

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +3,84° (C= 0,99, CHCl_3).

ν (cm^{-1}): 3449, 3012, 2936, 1717, 1654, 1430, 1235, 1030, 971, 933, 720.

^1H RMN (400MHz, CDCl_3 , ppm): 5,59–5,69 (m, 2H, **H5**, **H6**); 4,95 (dt, $J=8,8$ Hz, 4,0Hz, 1H, **H2**); 3,90 (dt, $J=2,1$ Hz, 1H, **H1**); 2,54 (s large, 1H, **OH**); 2,38–2,42 (m, 2H, **CH**₂); 2,04–2,25 (m, 7H, **CH**₂ et **CH**₃); 1,68–1,74 (m, 2H, **CH**₂).

^{13}C RMN (100MHz, CDCl_3 , ppm): 170,7 (**C1'**); 129,5 (**C5** ou **C6**); 128,6 (**C5** ou **C6**); 77,2 (**C2**); 72,1 (**C1**); 32,7 (**C8**); 30,0 (**C3**); 22,8 (**C4** ou **C7**); 22,8 (**C4** ou **C7**); 21,2 (**C2'**).



Chromatogramme du (1*S*,2*S*)-Acétate de (Z)-(1*R*,8*R*)-8-hydroxy-cyclooct-4-ényle

Diesters éthylique de 3 hydroxy-2,4-dimétyle pentyle (19)

	$C_{11}H_{20}O_5$ MM : 232,37g.mol ⁻¹ Huile incolore Eb = 85-90°C sous 0,4mmHg Rdt : 85%
--	---

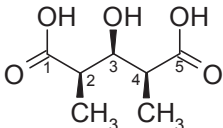
Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte d'argon, dans un bicol muni d'un réfrigérant et d'une ampoule à additionner, une suspension de zinc (16,5g, 253mmol, 2,4eq) activé depuis moins de 48h, est agitée à température ambiante pendant trente minutes avec du chlorure de triméthylsilyle (2,1g 16,5mmol) dans de l'éther anhydre (170mL). Le formiate d'éthyle (8,5mL 106mmol) est alors introduit à la seringue, puis goutte à goutte l' α -bromopropionate d'éthyle (30,5mL, 234mmol, 2,22eq) est additionné sur une période de vingt minutes. Après deux heures à température ambiante, le milieu réactionnel est coulé dans une solution glacée saturée de NH_4Cl (250mL). Après dix minutes sous agitation, la phase aqueuse est extraite avec de l'éther (3x80mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées successivement avec une solution aqueuse glacée de HCl 6N (100mL) puis à la saumure (2x50mL) et enfin séchées sur $MgSO_4$. Après évaporation des solvants sous pression réduite le résidu est distillé sous le vide d'une pompe à palettes pour donner l'hydroxy-diester (**19**) sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 85% (20,96g, 90,2mmol).

¹H RMN (400MHz, $CDCl_3$, ppm) : 1,17-1,37 (m, 12H, 4x CH_3); 2,49-2,69 (m, 2H, **H2** et **H4**); 3,09 (d, 1H, $J=3,5$ Hz, **OH**) ; 3,12 (d, 1H, $J=6,2$ Hz, **OH**); 3,23 (d, 1H, $J=9,1$ Hz, **OH**); 3,94-4,04 (m, 1H, **H3**); 4,06-4,23 (m, 4H, **H1'** et **H1''**).

¹³C RMN (100MHz, $CDCl_3$, ppm) : 175,8 ; 175,5 ; 175,3 ; 75,6 ; 73,6 ; 72,0 ; 60,6 ; 42,9 ; 42,4 ; 42,3 ; 42,2 ; 14,5 ; 14,5 ; 14,1 ; 14,0 ; 12,1 ; 10,9.

Diacides 3-hydroxy-2,4-diméthyl-pentanoïques (20)

	$C_7H_{12}O_5$ MM = 176,1623 g.mol ⁻¹ Cristaux blancs F = 140°C Rdt : 91% (mélange)
---	--

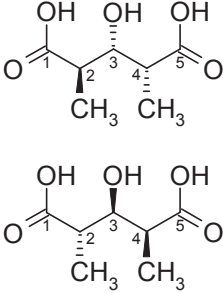
Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte d'argon, l'hydroxy-diester (**19**) (27,0g, 116mmol, 1eq) en suspension dans l'eau (130mL) et de la soude (9,5g-233mmol-2eq) est laissé sous agitation à température ambiante pendant dix heures à température ambiante puis le mélange est porté à 90°C pendant deux heures. Un mélange glacé de HCl 6N (50mL) et d'éther (90mL) est ajouté dans le milieu réactionnel. La solution est saturée avec du chlorure de sodium et laissée sous agitation durant une heure. La phase aqueuse est extraite à l'éther (8x100mL); les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le résidu est séché sous vide en présence de P₂O₅ et de KOH. L'hydroxydiacide (**20**) (18,6g, 106mmol) est obtenu avec un rendement de 91%. Le mélange de diastéréoisomères est obtenu sous forme d'une huile semi-cristalline de couleur blanc cassé.

L'huile (35,2g-200mmol) cristallise par trituration dans l'éther (70mL). La recristallisation des cristaux (13,1g) dans un mélange acétone (30mL)-dichlorométhane (25mL) fournit l'hydroxy-diacide *s,s* (**20a**) sous forme de cristaux blancs avec un rendement de 34% (12,0g, 68mmol).

¹H RMN (400MHz, acétone d-6, ppm) : 4,30 (t, 1H, *J*=6,0 Hz, **H3**) ; 2,66-2,75 (dq, 2H, *J*=6,0 Hz, *J*=7,0 Hz, **H2** et **H4**) ; 1,34 (d, 6H, *J*=7,0 Hz, 2x**CH3**).

¹³C RMN (D₂O, ref. MeOH, ppm) : 179,5 (**C1** et **C5**) ; 73,4 (**C3**) ; 43,7 (**C2** et **C4**) ; 11,9 (**CH3**).

	<p>$C_7H_{12}O_5$ MM : 176,1623 g.mol⁻¹ Cristaux blancs F = 90°C Rdt : 26%</p>
---	--

L'évaporation des eaux mères obtenues précédemment fournit une huile qui, par trituration avec de l'éther diisopropylique, donne avec un rendement de 26% des cristaux blancs riches en isomère *d,l* **20b** (9g, 51mmol).

¹³C RMN (400MHz, D₂O, ref. MeOH, ppm) : 180,0 (C1 ou C5) ; 178,1 (C1 ou C5) ; 73,9 (C3) ; 44,4 (C2 ou C4) ; 42,3 (C2 ou C4) ; 14,0 (CH3) ; 9,6 (CH3).

Diester méthylique de (2*S*,3*S*,4*R*)-3-Hydroxy-2,4-diméthyl-pentylediméthyl ester (**21**)

	<p>$C_9H_{16}O_5$ MM : 204,22g.mol⁻¹ Huile incolore Rdt : 91%</p>
---	--

Synthèse chimique :

Sous atmosphère inerte d'argon, une suspension de l'hydroxy-diacide *syn,syn* (**20a**) (1,5g-8,5mmol-1eq) est agitée dans un mélange d'éther et de méthanol (2,5mL / 2,5mL) à 0°C. Le triméthylsilyl diazométhane (9mL-18mmol-2,1eq) est additionné goutte à goutte sur une période de trente minutes. Après trente minutes sous agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré sous vide. Le résidu est purifié sur colonne de chromatographie de (dichlorométhane/ méthanol : 95/5). On récupère ainsi l'hydroxy-diester

méthylrique *syn,syn* (**21**) sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 91% (1,58g, 7,7mmol).

ν (cm⁻¹) : 3497 ; 1727 ; 1436 ; 1197 ; 1053.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 4,09-4,13 (m, 1H, **H3**) ; 3,70 (s, 6H,, **H1'** et **H1''**) ; 3,00 (d, 1H, *J*=3,4 Hz, OH) ; 2,56-2,62 (m, 2H, **H2** et **H4**) ; 1,25 (d, 6H, *J*=7,1 Hz, 2xCH₃).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 175,7 (**C1** et **C5**) ; 72,0 (**C3**) ; 51,8 (**C1'** et **C1''**) ; 42,3 (**C2** et **C4**) ; 12,1 (2xCH₃).

Acétylation du triol *syn,syn* (22**) par la lipase B de *Candida antarctica* en chauffage classique (METHODE V)**

Sous atmosphère inerte d'argon, à une solution de triol *s,s* (**22**) (100mg, 0,67mmol, 1eq) dissout dans le tétrahydrofurane ou l'hexane (10mL) sont ajoutés l'acétate de vinyle (0,2mL, 2,02mmol) fraîchement distillé et la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (10mg). Après agitation pendant 90 ou 160 heures à 0°C, température ambiante ou 35°C, le mélange est filtré et les solvants sont évaporés sous pression réduite. La purification du mélange par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol : 95/5) permet de récupérer le monoacétate (**23**) et le diacétate (**24**) à l'état pur.

Acétylation du triol *syn,syn* (22**) par la lipase B de *Candida antarctica* sous irradiation micro-onde (METHODE W)**

Sous atmosphère inerte d'argon, à une solution de triol *syn,syn* (**22**) (100mg, 0,67mmol) dissout dans l'hexane (10mL) sont ajoutés l'acétate de vinyle (0,2mL, 2,02mmol) fraîchement distillé et la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée sur résine acrylique (10mg). Après irradiation sous champ micro-onde en système ouvert à 35°C, 60°C ou 100°C pendant une heure, le mélange est filtré et les solvants sont évaporés sous pression réduite. La purification du mélange par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol : 95/5) permet de récupérer le monoacétate (**23**) et le diacétate (**24**).

Acétylation du triol monoprotégé *syn,syn* (22) par la lipase B de *Candida antarctica* (METHODE X).

Sous atmosphère inerte d'argon, à une solution de diol silylé *syn,syn* (27) (100mg, 0,38mmol) dissout dans de l'hexane (10mL) sont ajoutés l'acétate de vinyle (0,1mL, 1,14mmol) fraîchement distillé sur CaCl₂, ainsi que la lipase B de *Candida antarctica* (10mg). Après agitation à 0°C pendant deux jours puis à température ambiante pendant quatre jours, la lipase est filtrée sur verre fritté, et le solvant évaporé sous pression réduite. La purification du mélange par chromatographie sur gel de silice (DCM 100%) permet l'obtention du monoacétate (27) à l'état pur.

Acétylation du triol *syn,syn* (22) par la cutinase en chauffage classique (METHODE Y)

Sous atmosphère inerte d'argon, à une solution de triol *syn ,syn* (22) (50mg, 0,34mmol) dissout dans le dichlorométhane (10mL) sont ajoutés l'acétate de vinyle (0,1mL, 2,02mmol); fraîchement distillé et la cutinase (4mg). Après agitation pendant 90 ou 160 heures, le mélange est filtré et les solvants sont évaporés sous pression réduite. La purification du mélange obtenu par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol : 95/5) permet de récupérer le monoacétate (23) et le diacétate (24).

(2R,3R,4S)-2,4-Dimethyl-pentane-1,3,5-triol (22)

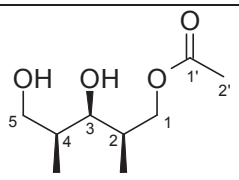
	$C_7H_{16}O_3$ MM : 148,2 g.mol ⁻¹ Cristaux blancs F = 88-90°C Rdt : 80%
--	---

Sous atmosphère inerte d'argon, une suspension d'hydrure d'aluminium et de lithium (0,45g, 11,8mmol, 2,04eq) dans 9mL de tétrahydrofurane anhydre est refroidie à 0°C. La solution d'hydroxydiester (**21**) (1,2g-5,9mmol) est alors additionnée en une heure et à 0°C dans du tétrahydrofurane anhydre (4mL). Après trois heures sous agitation à température ambiante, la saumure est additionnée goutte à goutte pour coller l'alumine. Les solides sont lavés au tétrahydrofurane (4x20mL). Les phases organiques récupérées sont séchées sur MgSO₄ puis concentrées sous pression réduite. Le résidu est placé dans un dessiccateur sur P₂O₅ puis recristallisé dans de l'acétone anhydre (2mL). On récupère ainsi le triol *syn,syn* (**22**) (0,703g, 4,7mmol) sous forme de cristaux blancs avec un rendement de 80%.

¹H RMN (400MHz, D₂O, ppm) : 4,80 (s, 3H, 3xOH) ; 3,63 (dd, 2H, *J*=6,5 Hz, **H1** et **H5**) ; 3,56 (t, 1H, *J*=6,5 Hz, **H3**) ; 3,49 (dd, 2H, *J*=6,5 Hz, **H1** et **H5**) ; 1,81-1,91 (m, 2H, **H2** et **H4**) ; 0,97 (d, 6H, *J*=7,0 Hz, 2xCH₃).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 73,2 (**C3**) ; 64,8 (**C2** et **C4**) ; 37,6 (**C1** et **C5**) ; 11,4 (**CH3**).

Acétate de (2*R*,3*R*,4*S*)-3,5-dihydroxy-2,4-diméthyl-pentyle (23)

	$C_{19}H_{18}O_4$ $MM = 190,24g.mol^{-1}$ Huile incolore
---	--

Le produit est obtenu par la méthode V ou Y.

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)	ee (%)
V	35	37	0
Y	t.a.	40	0

1H RMN (400MHz, $CDCl_3$, ppm) : 4,43 (m, 1H, **H1**) ; 4,18 (m, 1H, **H1**) ; 3,62-3,65 (m, 3H, **H5** et 2xOH) ; 3,37 (m, 1H, **H5**) ; 3,19 (t, 1H, $J=6,5$ Hz, **H3**) ; 2,33 (m, 1H, **H2**) ; 2,21 (s, 3H, **H2'**) ; 1,82 (m, 1H, **H4**) ; 0,96 (d, 6H, $J=6,8$ Hz (2x**CH₃**)).

^{13}C RMN (100MHz, $CDCl_3$, ppm) : 170,2 (**C1'**) ; 79,3 (**C3**) ; 67,1 (**C5**) ; 62,0 (**C1**) ; 35,6 (**C2**) ; 33,2 (**C4**) ; 30,8 (**CH₃**) ; 20,7 (**CH₃**) ; 12,7 (**CH₃**).

Diacétate de (2R,3R,4S)-3-hydroxy-2,4-diméthyl-pentyle (24)

	$C_{11}H_{20}O_5$ MM = 232,27 g.mol ⁻¹ Huile incolore
--	--

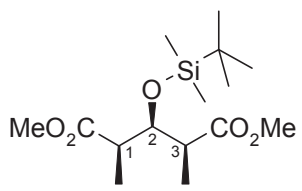
Le produit est obtenu par la méthode **V** ou **Y**.

Méthode	Température (°C)	Rdt (%)
V	35	37
Y	t.a.	40

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 4,43 (m, 2H, **H5** et **H1**) ; 4,18 (m, 2H, **H5** et **H1**) ; 3,58 (s, 1H, OH) ; 3,19 (t, 1H, *J*=6,5 Hz, **H3**) ; 2,33 (m, 2H, **H2** et **H4**) ; 2,21 (s, 6H, **C2'** et **C2''**) ; 0,96 (d, 6H, *J*=6,5 Hz, 2x CH₃).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 170,2 (**C1'** et **C1''**) ; 79,5 (**C1** et **C5**) ; 35,3 (**C2** et **C4**) ; 20,7 (**C2'** et **C2''**) ; 12,7 (2xCH₃).

Diacétate de (2*R*,3*R*,4*S*)-2,4-diméthyl-3-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-glutaryle (25)

	$C_{15}H_{30}O_5Si$ MM = 318,48g.mol ⁻¹ Huile incolore Rdt : 88%
---	--

Sous atmosphère inerte d'argon, le diester *s,s* **6** (0,5g-2,4mmol) est introduit avec du dichlorométhane anhydre (12mL) et de la 2,6-lutidine (1,2mL-9,8mmol) à -78°C. Le *tert*-butyldiméthylsilyl trifluorométhanesulfonate (1,4mL-6,1mmol-2,5eq) est ensuite additionné goutte à goutte en vingt minutes.

Le milieu réactionnel est agité à -78°C pendant deux heures puis à température ambiante pendant cinq heures. De la saumure (10mL) est additionnée puis la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle (2x10mL). Les phases organiques sont lavées avec une solution aqueuse saturée de NH₄Cl (10mL) puis avec de la saumure (10mL) avant d'être séchées sur MgSO₄. Le résidu obtenu après évaporation des solvants est purifié sur colonne de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle : 9/1) et séché dans un dessiccateur sur P₂O₅. Le diester silylé *syn,syn* (**25**) (0,680g, 2,1mmol) est obtenu avec un rendement de 88% sous forme d'une huile incolore.

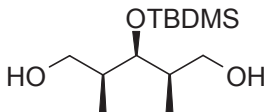
$\nu_{cm^{-1}}$: 2952 ; 1736 (C=O) ; 1253 ; 1057 ; 838.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 4,34-4,40 (m, 1H, **H2**) ; 3,66 (s, 6H, 2xOCH₃) ; 2,51-2,61 (m, 2H, **C1** et **C3**) ; 1,15 (d, 6H, *J*=7,0 Hz, C1CH₃ et C3CH₃) ; 0,85 (s, 9H, SiCH₃) ; 0,01 (s, 6H, SiC(CH₃)₃).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 175,1 (C=O) ; 73,9 (**C2**) ; 51,7 (**C1** et **C3**) ; 44,3(SiC(CH₃)₃) ; 25,9 (SiC(CH₃)₃) ; 18,2 (OCH₃) ; 12,2 (C3CH₃ et C1CH₃) ; -4,4 (SiCH₃).

SMHR calculée pour C₁₅H₃₀O₅ Na Si : 341.17602, trouvée : 341.1759

(2R,3R,4S)-2,4-diméthyl-3-(tert-butyldiméthylsilyloxy)-pentan-1,5-diol (26)

	<p>$C_{13}H_{30}O_3Si$ MM = 262,46g.mol⁻¹ Cristaux blancs F = 82°C Rdt : 82%</p>
---	--

Sous atmosphère inerte d'argon, le diester silylé s,s (**25**) (0,9g, 2,8mmol, 1eq) est introduit avec un mélange tétrahydrofurane/éthanol : 4/6 (20mL) et du chlorure de calcium (0,1g). Le borohydrure de sodium (1,0g, 28mmol, 10eq) est ensuite additionné. Le mélange est agité à température ambiante pendant vingt-quatre heures. Une solution aqueuse saturée de NH₄Cl est additionnée goutte à goutte afin de « coller » les sels de bore. Les solides sont lavés avec de l'acétate d'éthyle (2x10mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure puis séchées sur MgSO₄. Après évaporation des solvants le solide obtenu est purifié par lavage avec de l'hexane (2x10mL). Le diol silylé syn,syn(**26**) (0,605g, 2,3mmol) est obtenu avec un rendement de 82% sous forme de cristaux blancs.

v cm⁻¹ : 3267 (OH) ; 1251 ; 1019 ; 833 ; 772.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 3,91 (t, 1H, CHO, *J*=6,5 Hz); 3,60 (dd, 2H, 2xCHOH, *J*=6,5 Hz); 3,50 (dd, 2H, 2xCHOH, *J*=6,5 Hz); 2,22 (s, 2H, 2xOH); 1,91-2,01 (m, 2H, 2xCHCH₃); 0,91 (s, 15H, 5xCH₃); 0,10 (s, 6H, 2xSiCH₃).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : 74,5 (CHO) ; 66,2 (CH₂) ; 38,9 (CHCH₃) ; 25,9 (CCH₃) ; 18,2 (C) ; 12,7 (CH₃) ; -4,4 (SiCH₃)

SMHR calculée pour C₁₃H₃₀O₃Na Si :285.18619, trouvée :285.1861

Acétate de (2*R*,3*R*,4*S*)-2,4-diméthyl-3-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-pentane-5-diol (**27**)

	$C_{15}H_{32}O_4Si$ MM = 262,46g.mol ⁻¹ Cristaux blancs
--	--

Sous atmosphère inerte d'argon, au diester silylé *syn, syn* (**26**) (0,9g, 2,8mmol, 1eq) en solution dans un mélange tétrahydrofurane/éthanol : 4/6 (20mL) sont ajoutés le chlorure de calcium (0,1g) puis le borohydrure de sodium (1,0g, 28mmol, 10eq). Le mélange est mis sous agitation à température ambiante pendant vingt-quatre heures. Une solution aqueuse saturée de NH₄Cl est ensuite additionnée goutte à goutte. Le précipité formé est lavé plusieurs fois à l'acétate d'éthyle (2x10mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure puis séchées sur MgSO₄. Après évaporation sous pression réduite, le brut réactionnel est purifié par lavages dans l'hexane (2x10mL). Le diol silylé *s,s* (**26**) (0,605g, 2,3mmol) est obtenu à l'état pur avec un rendement de 82% et ce, sous forme de cristaux blancs.

Le produit est obtenu par la méthode **X** à t.a.

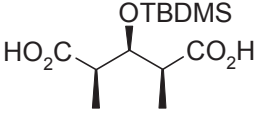
Méthode	Rdt (%)	ee (%)
X	28	0

ν cm⁻¹ : 3267 (OH) ; 1251 ; 1019 ; 833 ; 772.

¹H RMN (400MHz, CDCl₃, ppm) : 0,10 (s, 6H, 2xSiCH₃) ; 0,91 (s, 15H, 5xCH₃) ; 1,91-2,01 (m, 2H, 2xCHCH₃) ; 2,22 (s, 2H, 2xOH) ; 3,50 (dd, 2H, 2xCHOH, *J*=6,5 Hz) ; 3,60 (dd, 2H, 2xCHOH, *J*=6,5 Hz) ; 3,91 (t, 1H, CHO, *J*=6,5 Hz).

¹³C RMN (100MHz, CDCl₃, ppm) : -4,4 (SiCH₃) ; 12,7 (CH₃) ; 18,2 (C) ; 25,9 (CCH₃) ; 38,9 (CHCH₃) ; 66,2 (CH₂) ; 74,5 (CHO).

Acide (2*R*,3*R*,4*S*)-2,4-diméthyl-3-(*tert*-butyldiméthylsilyloxy)-glutarique (28)

	$C_{13}H_{26}O_5Si$ $MM = 290,43g.mol^{-1}$ Cristaux blancs $F = 135^{\circ}C$ Rdt : 78%
---	--

Sous atmosphère inerte d'argon, au diester méthylique silylé *s,s* (**25**) (1,0g, 3,14mmol, 1eq) dissout dans le méthanol absolu (2mL) à 0°C est ajoutée une solution de soude 2N (6mL, 12,6mmol, 4eq). Le mélange est ramené à température ambiante et laissé sous agitation pendant douze heures puis est porté à 90°C pendant trois heures. Après évaporation sous vide, une solution aqueuse glacée de HCl 1N est versée au brut réactionnel pour ramener le pH de la solution à 6-7. Le mélange est extrait à l'acétate d'éthyle (8x10mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées à la saumure (10mL) puis séchées sur MgSO₄ et évaporées sous vide. Après purification sur colonne de silice (dichlorométhane/ méthanol : 8/2), le diacide silylé *syn,syn* (**27**) (0,72g, 2,48mmol) est obtenu avec un rendement de 78% sous forme de cristaux blancs.

$\nu\text{ cm}^{-1}$: 3400-2400 ; 2930 ; 1707 ; 1460 ; 1252 ; 837 ; 777.

$^1H\text{ RMN (400MHz, } CDCl_3, \text{ ppm)}$: 0,01 (s, 6H) ; 0,82 (s, 9H) ; 1,15 (d, 6H, $J=7,0\text{ Hz}$) ; 2,56-2,61 (m, 2H) ; 4,35 (t, 1H, $J=6,5\text{ Hz}$).

$^{13}C\text{ RMN (100MHz, } CDCl_3, \text{ ppm)}$: -4,5 ; 11,9 ; 18,2 ; 25,9 ; 44,1 ; 73,9 ; 174,9.

Conclusion générale

Nous avons montré que la résolution biocatalysée sous irradiation micro-onde par amidification ou transestérification du mandélate de méthyle dépend non seulement des paramètres expérimentaux comme la température, le solvant, de la puissance d'irradiation mais surtout de la nature de la lipase utilisée (Schéma 145).

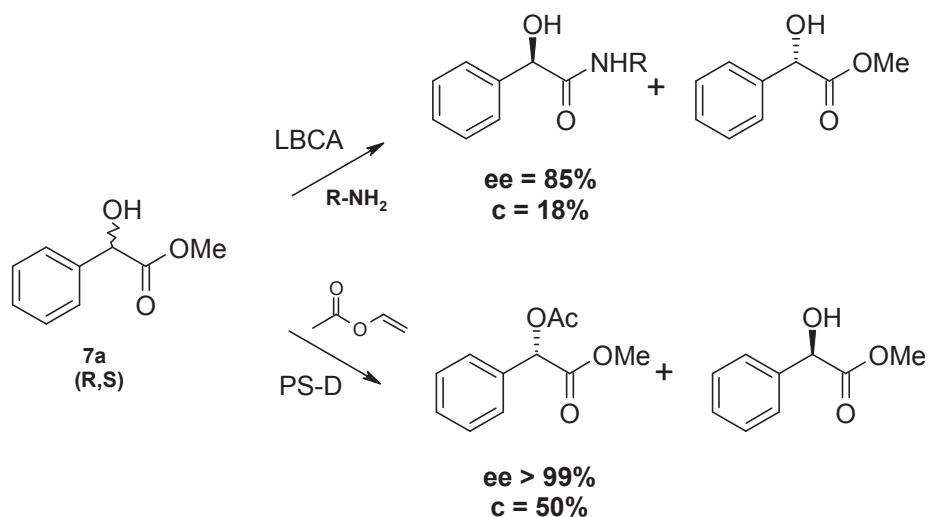


Schéma 145 : Résolution du mandélate de méthyle par amidification ou acétylation énantiosélective

Les lipases ne possèdent pas obligatoirement le même comportement suivant la réaction modèle étudiée. Alors que la lipase B de *Candida antarctica* est capable de résoudre avec un taux de conversion faible (18%) mais un excès énantiomérique satisfaisant de 85% le mandélate de méthyle par amidification, la lipase de *Pseudomonas cepacia* est hautement sélective de la (S)-O-acétylation du mandélate de méthyle, avec une conversion et sélectivité totale. Ces deux réactions sont dépendantes de plusieurs facteurs, dont la température, le solvant ou le temps réactionnel.

Bien qu'ayant un effet activateur indéniable, l'impact de l'irradiation micro-onde sur le système enzymatique est difficile à cerner.

Des réactions témoins ont donc été réalisées pour tenter de mieux appréhender le rôle de l'irradiation micro-onde. Des effets non thermiques ont ainsi été remarqués lors de l'acétylation du géraniol en comparant chauffage classique et sous irradiation micro-onde en système ouvert ou fermé (Schéma 146).

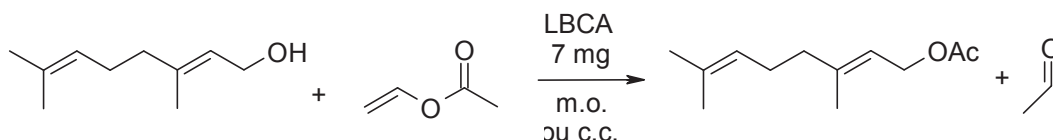


Schéma 146 : Acétylation du géraniol par la lipase B de *Candida antarctica*

De cette étude, il ressort qu'une très bonne activité de la lipase est observée dans une très large gamme de température, jusqu'à la dénaturation thermique totale de l'enzyme.

La stabilité enzymatique est néanmoins comparable que ce soit par chauffage classique ou par chauffage sous irradiation micro-onde.

Afin de mieux comprendre le rôle de l'irradiation micro-onde sur le système enzymatique, la lipase B de *Candida antarctica* a été irradiée à différentes puissances d'irradiation entre 5-300W. Cette étude a révélé que l'activité enzymatique varie énormément en fonction de la réaction étudiée. En effet, bien que l'activité enzymatique soit légèrement décroissante avec l'irradiation pour l'acétylation géraniol, cette activité est fortement activée avec l'irradiation lors de la résolution de l'hexan-2-ol.

Le savoir acquis en résolution enzymatique assistée par microonde a été mis à profit lors de la synthèse et la résolution d'alcools secondaires de types diols et triols.

Par un choix judicieux des paramètres expérimentaux, nous avons montré que nous pouvions obtenir de manière sélective les différents énantiomères du mélange racémique d'un diol homochiral monocyclique. L'utilisation de lipase B de *Candida antarctica* ou de lipase de *Pseudomonas cepacia*, montre une nette énantio-préférence différente suivant les deux enzymes testés (Schéma 147). L'optimisation des temps de réaction sous irradiation micro-onde devraient nous permettre d'obtenir la conversion totale du substrat dans un laps de temps assez court.

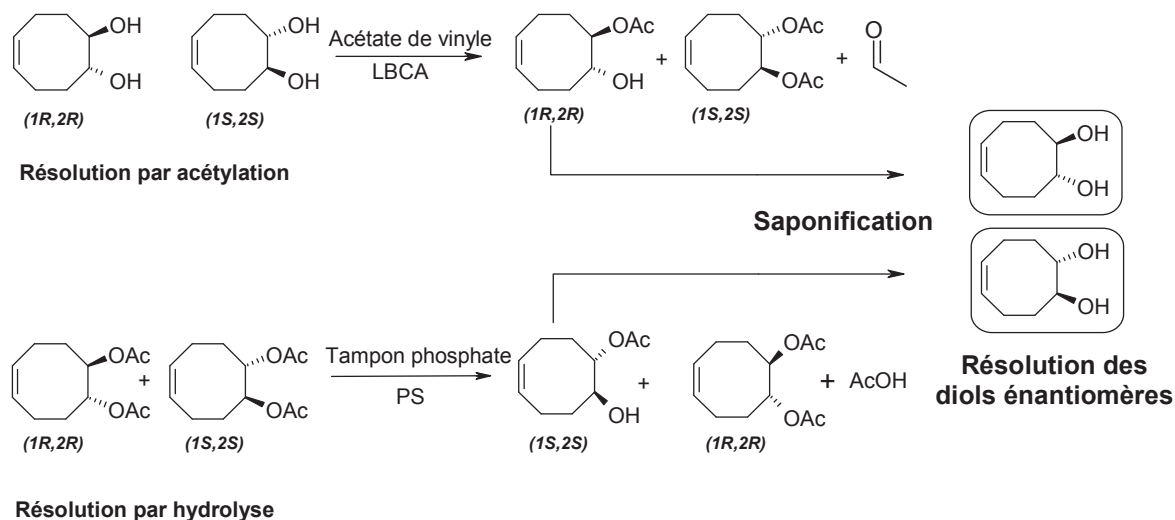


Schéma 147 : Résolution du diol cyclique homochiral par des lipases

Cependant, par la résolution d'un 1,3,5-triol prochiral syn,syn, nous avons montré l'importance du choix du système enzymatique pour mener à bien la résolution. L'utilisation de lipases dans ce cas précis s'est avérée être un échec. Le manque total de sélectivité nous a contraint à utiliser un enzyme mutant de type cutinase. Bien que la conversion soit satisfaisante, la sélectivité demeure nulle. Ces résultats décevants sont néanmoins prometteurs. Des études de modélisation moléculaire pour obtenir un candidat muté intéressant sont actuellement en cours au KTH de Stockholm et au sein de l'Université de la Rochelle.

Références bibliographiques

1. Patel R. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews*. **2008**, 252, 659–701.
2. Erb S. Single-enantiomer drugs poised for further market growth. *Pharmaceutical Technology*. **2006**, Oct 3.
3. Caprio V., Williams, J. Catalysis in asymmetric synthesis. Wiley-Backwell. Chichester. **2009**.
4. Ghanem A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*. **2007**, 63, 1721-1754.
5. Govindaraju K., Kiruthiga V., Manikandan R., Ashokkumar T., Singaravelu G. β -glucosidase assisted biosynthesis of gold nanoparticles: A green chemistry approach. *Materials Letters*. **2011**, 65, 256–259.
6. Assmuth T., Hildén M., Craye M. Beyond REACH: Roadblocks and shortcuts en route to integrated risk assessment and management of chemicals. *Science of The Total Environment*. **2010**, 408, 3954-3963.
7. Loupy, A. Microwaves in organic synthesis. **2006**, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim.
8. Réjasse B., Lamare S., Legoy M.D., Besson T. Influence of microwave irradiation on enzymatic properties: applications in enzyme chemistry. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2007**, 22, 518-526.
9. Nuchter M., Muller U., Ondruschka B. Microwave-assisted chemical reactions. *Chemical engineering and technology*. **2003**, 26, 1207-1216.
10. Zhu D., Mukherjee C., Hua L. “Green” synthesis of important pharmaceutical building blocks: enzymatic access to enantiomerically pure α -chloroalcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2005**, 16, 3275–3278.
11. Syrén P.O., Lindgren E., Hoeffken H.W., Branneby C., Maurer S., Hauer B., Hult K. Increased activity of enzymatic transacylation of acrylates through rational design of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 65, 3–10.
12. Padma V. Iyer P.V., Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*. **2008**, 43, 1019–1032.
13. Wong C.H, Whitesides G.M. Enzymes in Organic Chemistry. Tetrahedron Organic Chemistry volume 12. **1994**, Pergamon, Oxford.
14. Cherif S., Gargouri Y. Thermoactivity and effects of organic solvents on digestive lipase from hepatopancreas of the green crab. *Food Chemistry*. **2009**, 116, 82–86.

Références bibliographiques

15. Guncheva M., Zhiryakova D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2011**, 68, 1–21.
16. Gaur R., Gupta A., Khare S.K. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochemistry*. **2008**, 43, 1040–1046.
17. Fu D., Yu M., Tan T., Zhou X. Separation, characterization and catalytic properties of Lip2 isoforms from *Candida* sp. 99-125. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2009**, 56, 115–121.
18. Holmes R., VandeBerg J., Cox L. Comparative studies of vertebrate lipoprotein lipase: A key enzyme of very low density lipoprotein metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **2011**, 6, 224–234.
19. Overbeeke P., Govardhan C., Khalaf N., Jongejan J., Heijnen J. Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2000**, 10, 385–393.
20. Vidya P., Chadha A. *Pseudomonas cepacia* lipase catalyzed esterification and transesterification of 3-(furan-2-yl) propanoic acid/ethyl ester: A comparison in ionic liquids vs hexane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 65, 68–72.
21. Foresti M.L., Ferreira M.L. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses.. *Enzyme and Microbial Technology*. **2010**, 46, 419–429.
22. Prasad A., Husain M., Singh B., Gupta R., Manchanda V., Olsen C., Parmar V. Solvent-free biocatalytic amidation of carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*. **2005**, 46, 4511-4514.
23. Zhang Y., Liu J. Kinetic study of enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-ketoprofen ethyl ester using immobilized *T. laibacchii* lipase. *Biochemical Engineering Journal*. **2011**, 54, 40–46.
24. Singh M., Singh S., Singh R.S., Chisti Y., Banerjee U. Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 2116-2120.
25. Janes L.E., Kazlauskas R.J. Empirical rules for the enantiopreference of lipase from *Aspergillus niger* toward secondary alcohols and carboxylic acids, especially α -amino acids. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1997**, 8, 3719-3733.
26. Lafaquière V. Compréhension et prédiction de l'énantiosélectivité des lipases. Thèse de Doctorat à l'INSA de Toulouse. **2010**, 48-51.

Références bibliographiques

27. Chen C., Fujimoto Y., Girdaukas G., Sih C. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *Journal of the American Chemical Society*. **1982**, 104, 7294-7299.
28. De Oliveira E., Humeau C., Chebil L., Maia E., Dehez F., Maigret B., Ghoul M., Engasser J.-M. Molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, 59, 96–105.
29. Xu T., Gao B., Zhang L., Lin J., Wang X., Wei D. Template-based modeling of a psychrophilic lipase: Conformational changes, novel structural features and its application in predicting the enantioselectivity of lipase catalyzed transesterification of secondary alcohols. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2010**, 1804, 2183–2190.
30. Svedendahl M., Hult K., Berglund P. Fast Carbon–Carbon Bond Formation by a Promiscuous Lipase. *Journal of the American Chemical Society*. **2005**, 127, 17988-17999.
31. Syrén P.O., Lindgren E., Hoeffken H.W., Branneby C., Maurer S., Hauer B., Hult K. Increased activity of enzymatic transacylation of acrylates through rational design of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 65, 3-10.
32. Marton Z., Léonard-Nevers V., Syrén P.O., Bauer C., Lamare S., Hult K., Tran V, Graber M. Mutations in the stereospecificity pocket and at the entrance of the active site of *Candida antarctica* lipase B enhancing enzyme enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 65, 11–17.
33. O. Magnusson A.O., Takwa M., Hamberg A., Hult K. An *S*-Selective Lipase Was Created by Rational Redesign and the Enantioselectivity Increased with Temperature. *Angewandte Chemie International Edition*. **2005**, 117, 4658-4661.
34. Cygler M., Grochulski P., Kazlauskas R., Schrag J., Bouthillier F., Rubin B., Serreqi A., Gupta A. A structural basis for the chiral preferences of lipases. *Journal of the American Chemical Society*. **1994**, 116, 3180-3186.
35. Patkar S.A., Bjorking F., Zundel M., Schulein M., Svendsen A., Heldt-Hansen H.P., Gormsen E. Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors. *Indian Journal of Chemistry*. **1993**, 32, 76-80.
36. Hoegh I., Patkar S., Halkier T., Hansen M.T. Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Canadian Journal of Botanic*. **1995**, 73, 869-875.
37. Blank K., Morfill J., Gump H., Gaub H. Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. **2006**, 125, 474-483.
38. Domínguez de María P., Carboni-Oerlemans C., Tuin B., Bargeman G., van der Meer A., van Gemert R. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2005**, 37, 36–46.

Références bibliographiques

39. Ericsson D., Kasrayan A., Johansson P., Bergfors T., Sandström A., Bäckvall J., Mowbray S. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *Journal of Molecular Biology*. **2008**, 376, 109–119.
40. Majumder A., Ramesh N., Gupta M. A lipase catalyzed condensation reaction with a tricyclic diketone: yet another example of biocatalytic promiscuity. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 5190-5193.
41. Kobayashi T., Matsuo T., Kimura Y., Adachi S. Thermal Stability of Immobilized Lipase from *Candida antarctica* in Glycerols with Various Water Contents at Elevated Temperatures. *Journal of Oil Chemists' Society*. **2008**, 85, 1081-1084.
42. Jürgen Brem J., Liljeblad A., Paizs C., Toşa M., Irimie F., Kanerva L. Lipases A and B from *Candida antarctica* in the enantioselective acylation of ethyl 3-heteroaryl-3-hydroxypropanoates: aspects on the preparation and énantioprésérence. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2011**, 22, -315-322.
43. Dong H.P., Wang Y.J., Zheng Y.G. Enantioselective hydrolysis of diethyl 3-hydroxyglutarate to ethyl (*S*)-3-hydroxyglutarate by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 66, 90-94.
44. Rosset I., Tavares M., Assaf E., Porto A. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ¹H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. *Applied Catalysis A: General*. **2011**, 392, 136-142.
45. Orrego C.E., Salgado N., Valencia J.S., Giraldo G.I., Giraldo O.H., Cardona C.A. Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects. *Carbohydrate Polymers*. **2010**, 79, 9-16.
46. Rodrigues D., Mendes A., Adriano W., Gonçalves L., Giordano R. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2008**, 51, 100-109.
47. Kramer M., Cruz J., Pfromm P., Rezac M., Czermak P. Enantioselective transesterification by *Candida antarctica* Lipase B immobilized on fumed silica. *Journal of Biotechnology*. **2010**, 150, 80-86.
48. Adamczak M. Synthesis, properties and application of lipase from *Candida antarctica* for high yield monoacylglycerol synthesis. *Polish Journal of Food And Nutrition Sciences*. **2003**, 12, 3-8.
49. Karra-Châabouni M., Bouaziz I., Boufi S., Botelho do Rego A.M., Gargouri Y. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2008**, 66, 168-177.

Références bibliographiques

50. Li S-F., Chen J-P., Wu W-T. Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2007**, 47, 117-124.
51. Ye P., Xu Z., Wang Z., Wu J., Deng H., Seta P. Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2005**, 32, 115-121.
52. Bousquet-Dubouch M.P., Graber M., Sousa N., Lamare S., Legoy M.D. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2001**, 1550, 90-99.
53. Léonard-Nevers V., Marton Z., Lamare S., Hult K., Graber M. Understanding water effect on *Candida antarctica* lipase B activity and enantioselectivity towards secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2009**, 59, 90-95.
54. Erable B., Maugard T., Goubet I., Lamare S., Legoy M.D. Biotransformation of halogenated compounds by lyophilized cells of *Rhodococcus erythropolis* in a continuous solid-gas biofilter. *Process Biochemistry*. **2005**, 40, 45-51.
55. Erable B., Goubet I., Seltana A., Maugard T. Non-conventional gas phase remediation of volatile halogenated compounds by dehydrated bacteria. *Journal of Environmental Management*. **2009**, 90, 2841-2844.
56. Obermayer D., Glasnov T., Kappe O. Microwave-Assisted and Continuous Flow Multistep Synthesis of 4-(Pyrazol-1-yl)carboxanilides. *Journal of Organic Chemistry*. **2011**, 76, 6657-6659.
57. Marquez H., Loupy A., Calderon O, Pérez E. An eco-friendly protocol for synthesis of thiourea derivatives: 1-benzoyl-3-benzylguanidine and 1-benzoyl-3-benzyl-O-ethylisourea. A possible non-purely thermal microwave assisted reaction. *Tetrahedron*. **2006**, 62, 2616-2621.
58. Logé C., Testard A., Thiéry V., Lozach O., Blairvacq M., Robert J.M., Meijer L., Besson T. Novel 9-oxo-thiazolo[5,4-f]quinazoline-2-carbonitrile derivatives as dual cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)/glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2008**, 43, 1469-1477.
59. Parker M.C., Besson T., Lamare S., Legoy M.D. Microwave radiation can increase the rate of enzyme-catalyzed reactions in organic media. *Tetrahedron Letters*. **1996**, 37, 8383-8386.
60. Ramezanzadeh F., Rao R., Prinyawiwatkul W., Marshall W., Windhauser M.. Effects of microwave heat, packaging, and storage temperature on fatty acid and proximate compositions in rice bran. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **2000**, 48, 464-467.

Références bibliographiques

61. Matsui K.N., Granado L.M., Oliveira P.V., Tadini C.C. Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions. *LWT*. **2007**, 40, 852-859.
62. Ponne C.T., Moller A., Tijssens L.M.M., Bartels P.V., Meijer M.M.T. Influence of microwave and steam heating on lipase activity and microstructure of rapeseed (*Brassica napus*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **1996**, 44, 2818-2824.
63. Keying Q., Changzhong R., Zaigui L. An investigation on pretreatments for inactivation of lipase in naked oat kernels using microwave heating. *Journal of Food Engineering*. **2009**, 95, 280-284.
64. Hasan F., Shah A.A., Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, 39, 235-251.
65. Hernández-Martín E., Otero C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. *Bioresource Technology*. **2008**, 99, 277-286.
66. Akoh C., Chang S., Lee G., Shaw J. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **2007**, 55, 8995-9005.
67. Kamath H.V., Regupathi I., Saidutta M.B. Optimization of two step karanja biodiesel synthesis under microwave irradiation. *Fuel Processing Technology*. **2011**, 92, 100-105.
68. Talukder M., Wu J., Fen N., Li Y. Melissa S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*. **2010**, 49, 207-212.
69. Yu D., Tian L., Ma D., Wu H., Wang Z., Wang L. Fang X. Microwave-assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435. *Green Chemistry*. **2010**, 12, 844-850.
70. Trivedi R., Singh R.P. Modification of oils and fats to produce structure lipids. *Journal of Oleo Science*. **2005**, 54, 423-430.
71. Ferreira-Dias S., Correia A.C., Fonseca M.M. Response surface modeling of glycerolysis catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2003**, 21, 71-80.
72. Xia Y.M., Fang Y., Zhang K.C., Shi G.Y., Brown J.J. Enzymatic Synthesis of partial glycerol caprate in solvent-free media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2003**, 23, 3-8.
73. Saxena R.K., Isar J., Saran S., Kaushik R., Davidson W.S. Efficient microwave-assisted hydrolysis of triolein and synthesis of bioester, bio-surfactant and glycerides using *Aspergillus carneus* lipase. *Current Science*. **2005**, 89, 1000-1003.

Références bibliographiques

74. Matos L., Lealb I., Souza R. Diacylglycerol synthesis by lipase-catalyzed partial hydrolysis microwave irradiation and continuous flow conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2011**, 72, 36-39.
75. Singh J., Kaur L., McCarthy O.J. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocolloids*. **2007**, 21, 1-22.
76. Horchani H., Chaâbouni M., Gargouri Y., Sayari A. Solvent-free lipase catalyzed synthesis of long-chain starch esters using microwave heating: Optimization by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*. **2010**, 79, 466-474.
77. Chênevert R., Pelchat N., Morin P. Lipase-mediated enantioselective acylation of alcohols with functionalized vinyl esters: acyl donor tolerance and applications. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2009**, 20, 1191-1196.
78. Weber H., Zuegg J., Faber K., Pleiss J. Molecular reasons for lipase-sensitivity against acetaldehyde. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **1997**, 3, 131-138.
79. Bachu P., Gibson J.S, Sperry J., Brimble M.A. The influence of microwave irradiation on lipase-catalysed kinetic resolution of racemic secondary alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2007**, 18, 1618-1624.
80. Shah S., Gupta M. Kinetic resolution of (\pm)-1-phénylethanol in [Bmim][PF₆] using high activity preparations of lipases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2007**, 17, 921-924.
81. Xue P., Yan X., Wang Z. Lipase immobilized on HOOC-MCF: A highly enantioselective catalyst for transesterification resolution of (*R,S*)-1-phénylethanol. *Chinese Chemical Letters*. **2007**, 18, 929-932.
82. Habulin M., Knez Z. Optimization of (*R,S*)-1-phénylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2009**, 58, 24-28.
83. Chua L., Sarmidi M. Effect of solvent and initial water content on (*R,S*)-1-phénylethanol resolution. *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, 38, 551-556.
84. Carrillo-Munoz J.R., Bouvet D., Guibé-Jampel E., Loupy A., Petit A. Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions. Resolution of (+/-)-1-phénylethanol. *Journal of Organic Chemistry*. **1996**, 61, 7746-7749.
85. Bouzemi N., Aribi-Zouiouche L., Fiaud J-C. Combined lipase-catalyzed resolution/Mitsunobu esterification for the production of enantiomerically enriched arylalkyl carbinols. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2006**, 17, 797-800.
86. Octavio R., Souza M.A., Antunes O.A.C., Kroutil W., Kappe O. Kinetic resolution of *rac*-1-phénylethanol with immobilized lipases: a critical comparison of microwave and conventional heating protocols. *Journal of Organic Chemistry*. **2009**, 74, 6157-

Références bibliographiques

- 6162.
87. Lin G., Lin W. Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions. *Tetrahedron Letters*. **1998**, 39, 4333-4336.
 88. Straathof A., Panke S., Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology*. **2002**, 13, 548-556.
 89. Yu D., Wang Z., Chen P., Jin L., Cheng Y., Zhou J., Cao S. Microwave-assisted resolution of (*R,S*)-2-octanol by enzymatic transesterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2007**, 48, 51-57.
 90. Pellissier. Recent developments in dynamic kinetic resolution. *Tetrahedron*. **2011**, 67, 3769-3802.
 91. Turner N.J. Deracemisation methods. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, 14, 115-121.
 92. Cheng Y., Xu G., Wu J., Zhang C., Yang L. Highly efficient dynamic kinetic resolution of secondary aromatic alcohols with low-cost and easily available acid resins as racemization catalysts. *Tetrahedron Letters*. **2010**, 51, 2366-2369.
 93. Parvulescu A., Jacobs P., De Vos D. Support influences in the Pd-catalyzed racemization and dynamic kinetic resolution of chiral benzylic amines. *Applied Catalysis A: General*. **2009**, 368, 9-16.
 94. Yu D., Chen P., Wang L., Gu Q., Li Y., Wang Z., Cao S. A chemo-enzymatic process for sequential kinetic resolution of (*R,S*)-2-octanol under microwave irradiation. *Process Biochemistry*. **2007**, 42, 1312-1318.
 95. Durand J., Teuma E., Gómez M. Ionic liquids as a medium for enantioselective catalysis. *Comptes Rendus Chimie*. **2007**, 10, 152-177.
 96. Welton T. Room temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chemical Reviews*. **1999**, 99, 2071-2084.
 97. Zhou H., Chen J., Ye L., Lin H., Yuan Y. Enhanced performance of lipase-catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols in monoether-functionalized ionic liquids. *Bioresource Technology*. **2011**, 102, 5562-5566.
 98. Sheldon R.A., Lau R.M., Sorgedraeger M.J., Rantwijk F., Seddon K.R. Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chemistry*. **2002**, 4, 147-151.
 99. Zhao H., Baker G.A., Olubako O., Zanders L., Campbell S.M. Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2009**, 57, 149-157.
 100. Lundell K., Kurki T., Lindroos M., Kanerva L.T. Room temperature ionic liquids in the kinetic resolution of adrenaline-type aminoethanol by *Bukholderia cepacia* lipase

Références bibliographiques

- under normal and microwave irradiation. *Advance Synthesis and Catalysis*. **2005**, 347, 1110-1118.
101. Zeng J.B., Li Y.D., Zhu Q.Y., Yang K.K., Wang X.L., Wang Y.Z. A novel biodegradable multiblock poly(ester urethane) containing poly(L-lactic acid) and poly(butylene succinate) blocks. *Polymer*. **2009**, 50, 1178-1186.
102. Pereira C., Silva V., Rodrigues A. Ethyl lactate as a solvent: Properties, applications and production processes – a review. *Green Chemistry*. **2011**, 13, 2658-2671.
103. Major, B., Németh, G., Belafi-Bako, K., Gubicza, L. Unique role of water content in enzymatic synthesis of ethyl lactate using ionic liquid as solvent. *Chemical Papers*, **2010**, 64, 261-264.
104. Patel R. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coordination Chemistry Reviews*. **2008**, 252, 659-701.
105. Ditrich K. Optically active amines by enzyme-catalyzed kinetic resolution. *Synthesis*. **2008**, 14, 2283-2287.
106. Parvulescu A.N., Van der Eycken E., Pacobs P., De Vos D. Microwave-promoted racemization and dynamic kinetic resolution of chiral amines over Pd on alkaline earth supports and lipases. *Journal of Catalysis*. **2008**, 255, 206-212.
107. Fernández-Pérez M., Otero C. Enzymatic synthesis of amide surfactants from ethanolamine. *Enzyme and Microbial Technology*. **2001**, 28, 527-536.
108. Kidwai M., Poddar R., Mothsra M. *N*-acylation of ethanolamine using lipase: a chemoselective catalyst. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. **2009**, 5, 10-16.
109. Le Joubioux F., Achour O., Bridiau N., Graber M., Maugard T. Kinetic study of 2-butanol *O*-acylation and *sec*-butylamine *N*-acylation catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2011**, 70, 108-113.
110. Yadav G.D., Borkar I.V. Kinetic and Mechanistic Investigation of Microwave-Assisted Lipase Catalyzed Synthesis of Citronellyl Acetate. *Industrial Engineering Chemistry Research*. **2009**, 48, 7915-7922.
111. Fang Y., Huang W. Xia Y.M. Consecutive microwave irradiation induced substrate inhibition on the enzymatic esterification. *Process Biochemistry*. **2008**, 43, 306-310.
112. Réjasse B., Lamare S., Legoy M.D., Besson T. Influence of microwave irradiation on free *Candida antarctica* lipase B activity and stability. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2006**, 4, 3703-3707.
113. Leadbeater N., Stencil L., Wood E. Probing the effects of microwave irradiation on enzyme-catalysed organic transformations: the case of lipase-catalysed transesterification reactions. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2007**, 5, 1052-1055.

Références bibliographiques

114. Yadav G.D., Lathi P.S. Synergism between microwave and enzyme catalysis in intensification of reactions and selectivities: transesterification of methyl acetoacetate with alcohols. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. **2004**, 223, 51-56.
115. Sperry J., Lorenzo-Castrillejo I., Brimble M., Machín F. Pyranonaphthoquinone derivatives of eleutherin, ventiloquinone L, thysanone and nanaomycin A possessing a diverse topoisomerase II inhibition and cytotoxicity spectrum. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2009**, 17, 7131-7137.
116. Bachu P., Sperry J., Brimble M. Synthesis of a C8 oxygenated pyranonaphthoquinone: a useful precursor to dimeric pyranonaphthoquinones. *Tetrahedron*. **2008**, 64, 3343-3350.
117. Pchelka B., Loupy A., Petit A. Preparation of various enantiomerically pure (benzotriazol-1-yl)-and (benzotriazol-2-yl)-alkan-2-ols. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2006**, 17, 2516-2530.
118. Ebrahimpour A., Rahman R.N., Basri M., Salleh A.B. High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM. *Bioresource Technology*. **2011**, 13, 6972-6981.
119. Gelo-Pujic M., Guibé-Jampel E., Loupy A., Galema S. Mathé D. Lipase-catalysed esterification of some α -D-glucopyranosides in dry media under focused microwave irradiation. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. **1996**, 1, 2777-2780.
120. Overmeyer A., Schrader-Lippelt S., Kasche V., Brunner G. Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40 °C to 160 °C in supercritical CO₂. *Biotechnology Letters*. **1999**, 21, 65-69.
121. Ema T., Kageyama M., Korenaga T., Sakai T. Highly enantioselective lipase-catalyzed reactions at high temperatures up to 120°C in organic solvent. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2003**, 14, 3943-3947.
122. Iyer P.V., Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*. **2008**, 43, 1019-1032.
123. Réjasse B., Lamare S., Legoy M.D., Besson T. Stability improvement of immobilized *Candida antarctica* lipase B in an organic medium under microwave radiation. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2004**, 2, 1086-1089.
124. Rouillard H., Chérouvrier J.R., Thiéry V. Ultrasound and Microwave: Recent Advances in Organic Chemistry. **2011**, in press, Chapter 6: Biocatalysis under microwave irradiation. ISBN: 978-81-7895-532-2.
125. Chen W., Viljoen A.M. Geraniol : A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*, **2010**, 76, 643–651.

Références bibliographiques

126. Chutia M., Deka Bhuyan P., Pathak M.G., Sarma T.C., Boruah P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology*. **2009**, 42, 777-780.
127. Peres D.R., Da Silva M.G., Barreiros S. Water activity effects on previous geranyl acetate synthesis catalysed by Novozym in supercritical ethane and in supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 1884-1888.
128. Martins A., Graebin N., Lorenzoni A., Fernandez-Lafuente R., Ayub M., Rodrigues R. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. *Process Biochemistry*. **2011**, 46, 2311-2316.
129. Porcelli M., Cacciapuoti G., Fusco S., Massa R., d'Ambrosio G., Bertoldo C., De rosa M., Zappia V. Non-thermal effects of microwaves on proteins: thermophilic enzymes as model system. *FEBS Letters*. **1997**, 402, 102-106.
130. Pchelka B.K., Loupy A., Plenkiewicz J., Blanco L. Resolution of racemic 1-azido-3-aryloxy-2-propanols by lipase-catalyzed enantioselective acetylation. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2000**, 11, 719-732.
131. Shuang Lin S., Yun D., Qi D., Deng C., Li Y., Zhang X. Novel microwave-assisted digestion by trypsin-immobilized magnetic nanoparticles for proteomic analysis. *Journal of Proteome Research*. **2008**, 7, 1297-1307.
132. Wang Y., Wang R., Li Q., Zhang Z., Feng Y. Kinetic resolution of rac-alkyl alcohols via lipase-catalyzed enantioselective acylation using succinic anhydride as acylating agent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2009**, 56, 142-145.
133. Queiroz N., Graça Nascimento M. *Pseudomonas sp.* lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (*R,S*)-methyl mandelate. *Tetrahedron Letters*. **2002**, 43, 5225-5227.
134. Jurček O., Wimmerová M., Wimmer Z. Selected chiral alcohols: Enzymic resolution and reduction of convenient substrates. *Coordination Chemistry Reviews*. **2008**, 252, 767-781.
135. Zhou H., Chen J., Ye L., Lin H., Yuan Y. Enhanced performance of lipase-catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols in monoether-functionalized ionic liquids. *Bioresource Technology*. **2011**, 102, 5562-5566.
136. Bencze L.C., Paizs C., Toşa M.I., Trif M., Irimie F.D. CaL-B a highly selective biocatalyst for the kinetic resolution of furylbenzthiazole-2-yl-ethanols and acetates. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, 21, 1999-2004.
137. Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J. *Hydrolases in Organic synthesis* 2nd Ed. **2006**. WILEY-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 99-124.

Références bibliographiques

138. Van Rantwijk F., Madeira R., Lau, Sheldon R. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *TRENDS in Biotechnology*. **2003**, 21, 131-138.
139. Van Rantwijk F., Sheldon R. Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical Review*. **2007**, 107, 2757-2785.
140. Ahluwalia A., Perretti M. B1 receptors as a new inflammatory target. Could this B the 1?. *Trends in pharmacological sciences*. **1999**, 20, 99-103.
141. Bodmer-Narkevitch V., Anthony N., Cofre V., Jolly S., Murphy K., Ransom R., Reiss D, Tang C., Thomayant Prueksaritanont T., Pettibone D., Bock M., Kuduk S. Indazole derivatives as novel bradykinin B1 receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, 20, 7011-7014.
142. Gardes J., Michineau S., Pizard A., Alhenc-Gelas F., Rajerison R. Aspirin inhibits human bradykinin B2 receptor ligand binding function. *Biochemical Pharmacology*. **2008**, 75, 1807-1816.
143. Liu Q., Qian W., Li A., Biswas K., Chen J., Fotsch C., Han N., Yuan C., Arik L, Biddlecome G., Johnson E., Kumar G., Lester-Zeiner D., Ng G., Hungate R., Askew B. Aryl sulfonamides containing tetralin allylic amines as potent and selective bradykinin B1 receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, 20, 4593-4597.
144. Wood M., Schirripa K., Kim J., Kuduk S., Chang R., Di Marco C., Di Pardo R., Wan B., Murphy K. Ransom R., Chang R., Holahann M. α -Hydroxy amides as a novel class of bradykinin B1 selective antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, 18, 716-720.
145. Kuduk S., Chang R., DiPardo R., Di Marco C., Murphy K., Ransom R. Bradykinin B1 receptor antagonists: An α -hydroxy amide with an improved metabolism profile. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, 18, 5107-5110.
146. Lkhagvaa B., Tani K., Sato K., Toyoda Y., Suzuka C., Sone S. Bestatin, an inhibitor for aminopeptidases, modulates the production of cytokines and chemokines by activated monocytes and macrophages. *Cytokine*. **2008**, 44, 386-391.
147. George S., Suryavanshi G., Sudalai A. A short enantioselective synthesis of (-)-bestatin via l-proline-catalyzed α -amination of an aldehyde. *Tetrahedron Letters*. **2008**, 49, 6791-6793.
148. Velmourougane G., Harbut M., Dalal S., McGowan S., Oellig C., Meinhardt N., Whisstock J., Klemba M., Greenbaum D. Synthesis of New (-)-Bestatin-Based Inhibitor Libraries Reveals a Novel Binding Mode in the S1 Pocket of the Essential Malaria M1 Metalloaminopeptidase. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, 54 , 1655–1666.

Références bibliographiques

149. Dalal S., Klemba M. Roles for two aminopeptidases in vacuolar hemoglobin catabolism in *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*. **2007**, 282, 35978–35987.
150. Berg. Functional characterisation of penicillin production strains. *Fungal Biology Reviews*. **2010**, 24, 73-78.
151. Brakhage A., Thön M, Spröte P, Scharf D., Al-Abdallah Q., Wolke S., Hortschansky P. Aspects on evolution of fungal β -lactam biosynthesis gene clusters and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry*. **2009**, 1801-1811.
152. Tang K., Wang J., Hou Q., Cheng X., Liu Y. Computational predictions on the stereoselectivity carbene catalyzed b-lactam synthesis. *Tetrahedron : asymmetry*. **2011**. doi:10.1016/j.tetasy.2011.05.019.
153. Kobayashi Y., Takemoto Y., Kamijo T., Harada H., Ito Y., Terashima S. A stereoselective synthesis of the (2*R*, 3*S*)- and (2*S*, 3*R*)-3-amino-2-hydroxybutyric acid derivatives, the key components of a renin inhibitor and bestatin. *Tetrahedron*. **1992**, 48, 1853-1868.
154. Blay G., Fernández I., Monje B., Pedro J. Diastereoselective Michael addition of (*S*)-mandelic acid enolate to nitroalkenes. Enantioselective synthesis of α -hydroxy- α,β -diaryl- γ -lactams. *Tetrahedron*. **2004**, 60, 165-170.
155. Geffen Y., Nudelman A., Gil-Ad I.,Rephaeli A., Huang M., Savitsky K., Klapper L., Winkler I., Meltzer H., Weizman A. BL-1020: A novel antipsychotic drug with GABAergic activity and low catalepsy, is efficacious in a rat model of schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*. **2009**, 19, 1-13.
156. Luchetti S., Huitinga I., Swaab D. Neurosteroid and gaba-a receptor alterations in alzheimer's disease, parkinson's disease and multiple sclerosis. *Neuroscience*. **2011**, 191, 6-21.
157. Ordóñez M., Labastida-Galván V., Lagunas-Rivera S. Stereoselective synthesis of GABOB, carnitine and statine phosphonates analogues. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, 129-147.
158. Okano K. Synthesis and application of chiral hydrobenzoin. *Tetrahedron*. **2011**, 63, 2483-2512.
159. Blay G., Fernández I., Monje B., Montesinos-Magraner M., Pedro J. (*S*)-Mandelic acid enolate as a chiral benzoyl anion equivalent for the enantioselective synthesis of non-symmetrically substituted benzoin. *Tetrahedron*. **2011**, 67, 881-890.
160. Tuchinda P., Munyoo B., Pohmakotr M., Thinapong P., Sophasan S., Santisuk T., Reutrakul V. Cytotoxic Styryl-Lactones from the Leaves and Twigs of *Polyalthia crassa*. *Journal of Natural Products*. **2006**, 69, 1728-1733.

Références bibliographiques

161. Shekhar V., Reddy D.K., Suresh V., Babu D.C., Venkateswarlu Y. First total synthesis of (+)-crassalactone A. *Tetrahedron Letters*. **2010**, 51, 946-948.
162. Saito R, Naruse S, Takano K, Fukuda K, Katoh A, Inoue Y. Unusual temperature dependence of enantioselectivity in asymmetric reductions by chiral NADH models. *Organic Letters*. **2006**, 8, 2067-2070.
163. E. Schmitt, I. Schiffers, C. Bolm. Organocatalytic conversion of arylglyoxals into optical active mandelic acid derivatives. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 3185-3188.
164. Yadav G.D., Sivakumar P. Enzyme-catalysed optical resolution of mandelic acid via (*RS*)-methyl mandelate in non-aqueous media. *Biochemical Engineering Journal*. **2004**, 19, 101-107.
165. Yadav G.D., Sajgure A., Dhoot S. Insight into microwave irradiation and enzyme catalysis in enantioselective resolution of *RS*-(±)-methyl mandelate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **2008**, 83, 1145-1153.
166. Chen Y., Xu J., Xu X., Xia Y., Lin H., Xia S., Wang L. Enantiocomplementary preparation of (*S*)- and (*R*)-mandelic acid derivatives via α -hydroxylation of 2-arylacetic acid derivatives and reduction of α -ketoester using microbial whole cells. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2007**, 18, 2537-2540.
167. Bodlenner A., Glueck S., Nestl B., Gruber C., Baudendistel N., Hauer B., Kroutil W., Faber K. Biocatalytic racemization of α -hydroxycarboxylic acids using a stereo-complementary pair of α -hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Tetrahedron*. **2009**, 65, 7752-7755.
168. Dąbkowska K., Szewczyk K. Influence of temperature on the activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase in the kinetic resolution of mandelic acid enantiomers. *Biochemical Engineering Journal*. **2009**, 46, 147-153.
169. Pilissão C., Nascimento M. Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (*RS*)-methyl mandelate catalyzed by lipases. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2006**, 17, 428-433.
170. Omata Y., Kakehi A., Shirai M., Kamimura A. Stereoselective formation of optically active 2-oxy-1,3-oxazolidin-4-ones and an efficient synthesis of optically active secondary 2-pyrrolidones. *Tetrahedron Letters*. **2002**, 43, 6911-6914.
171. Kamimura A., Tanaka K., Hayashi T., Omata Y. A convenient synthesis of medium-sized lactams through RCM reaction of oxyoxazolidinones. *Tetrahedron Letters*. **2006**, 47, 3625-3627.
172. Anwar M., Cowley A., Moloney M. Novel chiral pyrrolidinone scaffolds derived from threonine with antibacterial activity. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, 21, 1758-1770.

Références bibliographiques

173. Dambacher J., Anness R., Pollock P., Bergdahl M. Highly diastereoselective conjugate additions of monoorganocopper reagents to chiral imides. *Tetrahedron*. **2004**, 60, 2097-2110.
174. Zeror S., Collin J., Fiaud J.C., Zouioueche L. Enantioselective ketoester reductions in water: a comparison between microorganism- and ruthenium-catalyzed reactions. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, 21, 1211-1215.
175. Chadha A., Baskar B. Biocatalytic deracemisation of α -hydroxy esters: high yield preparation of (*S*)-ethyl 2-hydroxy-4-phénylbutanoate from the racemate. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2002**, 13, 1461-1464.
176. Kamimura A., Omata Y., Tanaka K., Shirai M. Oxyoxazolidinone as an auxiliary for heterocyclic synthesis. Enantioselective formation of *N*-unprotected 2-pyrrolidones from selenocarboxylate and allylamines via radical cyclization. *Tetrahedron*. **2003**, 59, 6291-6299.
177. Thvedt T., Fuglseth E., Sundby E., Hoff B. Enantioenriched 1-aryl-2-fluoroethylamines. Efficient lipase-catalysed resolution and limitations to the Mitsunobu inversion protocol. *Tetrahedron*. **2010**, 66, 6733-6743.
178. Dhake K., Qureshi Z., Singhal R., Bhanage B. *Candida antarctica* lipase B-catalyzed synthesis of acetamides using [BMIM(PF₆)] as a reaction medium. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 2811-2814.
179. Kim K.K., Song H.K., hin D.H., Hwang K.Y., Suh S.W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*. **1997**, 5, 173-185.
180. Torres S., Castro G.R. Non-Aqueous Biocatalysis in Homogeneous Solvent Systems. *Food Technology and Biotechnology*. **2004**, 42, 271-277.
181. Doukyu N., Ogino H. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*. **2010**, 48, 270-282.
182. He W., Jia C., Ma Y., Yang Y., Zhang X., Feng B., Yue L. Lipase-catalyzed synthesis of phytostanyl esters in non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 67, 60-65.
183. Dąbkowska K., Szewczyk K. Influence of temperature on the activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase in the kinetic resolution of mandelic acid enantiomers. *Biochemical Engineering Journal*. **2009**, 46, 147-153.
184. Ragupathy L., Pluhar B., Ziener U., Keller H., Dyllick-Brenzinger R., Landfester K. Enzymatic aminolysis of lactones in aqueous miniemulsion: Catalysis through a novel pathway. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 62, 270-276.

Références bibliographiques

185. Pilissão C., De Oliveira Carvalho P., Da Graça Nascimento M. Enantioselective acylation of (*RS*)-phénylethylamine catalysed by lipases. *Process Biochemistry*. **2009**, 44, 1352-1357.
186. Ong A.L., Kamaruddin A.H., Bhatia S., Long W.S., Lim S.T., Kumari R. Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (*R*)-ketoprofen. *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, 39, 924-929.
187. Dong H.P., Wang Y.J., Zheng Y.G. Enantioselective hydrolysis of diethyl 3-hydroxyglutarate to ethyl (*S*)-3-hydroxyglutarate by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2010**, 66, 90-94.
188. Kim J., Haam S., Park D.W., Ahn I.S., Lee T., Kim H.S., Kim W.S. Biocatalytic esterification of β -methylglucoside for synthesis of biocompatible sugar-containing vinyl esters. *Chemical Engineering Journal*. **2004**, 99, 15-22.
189. Villeneuve P. Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*. **2007**, 25, 515-536.
190. Queiroz N., Graça Nascimento M. *Pseudomonas sp.* lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (*R,S*)-methyl mandelate. *Tetrahedron Letters*. **2002**, 43, 5225-5227.
191. Toshiyuki I., Yuichi M., Yoshikazu A., Shi-Hui H., Shohei W., Shuichi H., Motoi K., Higeomi T., Minoru M., Yoshihiko H. Increased Enantioselectivity and Remarkable Acceleration of Lipase-Catalyzed Transesterification by Using an Imidazolium PEG-Alkyl Sulfate Ionic Liquid. *Chemistry : A European Journal*. **2006**, 12, 9228-9237.
192. Chen C.T., Bettigeri S., Weng S.S., Pawar V., Lin Y.H., Liu C.Y., Lee W.Z. Asymmetric Aerobic Oxidation of α -Hydroxy Acid Derivatives by C₄-Symmetric, Vanadate-Centered, Tetrakisvanadyl(V) Clusters Derived from N-Salicylidene- α -aminocarboxylates. *Journal of Organic Chemistry*. **2007**, 72, 8175-8185.
193. Isaka M., Palasarn S., Auncharoen P., Komwijit S., Jones G. Acremoxanthonones A and B, novel antibiotic polyketides from the fungus *Acremonium sp.* BCC 31806. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 284-287.
194. Tomishima M., Ohki H., Yamada A., Maki K., Ikeda F. Novel echinocandin antifungals. Part 1: Novel side-chain analogs of the natural product FR901379. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, 18, 1474-1477.
195. Smith A., Freeze S. (+)-Discodermolide: total synthesis, construction of novel analogues, and biological evaluation. *Tetrahedron*. **2008**, 64, 261-298.
196. Mishra B., Tiwari V. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2011**, 46, 4769-4807.

Références bibliographiques

197. Koh C., Kini M. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. *Toxicon*. **2011**, doi:10.1016/j.toxicon.2011.03.017.
198. Fu F., Loh T.P. An asymmetric synthesis of the polyol fragment of the polyene macrolide antibiotic RK-397. *Tetrahedron Letters*. **2009**, 50, 3530-3533.
199. Kalaitzis J., Cheng Q., Meluzzi D., Xiang L., Izumikawa M., Dorrestein P., Moore B. Policing starter unit selection of the enterocin type II polyketide synthase by the type II thioesterase EncL. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2011**, 19, 6633-6638.
200. Bonini C., Chiummiento L., Funicello M., Lupattelli P., Videtta V. A first convergent synthesis of the polyolic fragment of the antifungal pentaene macrolide strevertene A. *Tetrahedron Letters*. **2008**, 49, 5455-5457.
201. Ye Z., Gao T., Zhao G. Enantioselective total synthesis of the proposed structure of macrolide iriomoteolide-1b. *Tetrahedron*. **2011**, 67, 5979-5989.
202. Tanaka M., Toyofuku E., Demizu Y., Yoshida O., Nakazawa K., Sakai K., Suemune H. Asymmetric ring cleavage reaction with a combination of optically active cycloalkane-1,2-diol and Lewis acid: application to formal synthesis of (-)-alloyohimbane and approach to construction of adjacent chiral quaternary centers. *Tetrahedron*. **2004**, 60, 2271-2281.
203. Olsson C., Friberg A., Frejd T. Bicyclic diols and related derivatives as catalysts for the asymmetric diethylzinc addition to benzaldehyde. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2008**, 19, 1473-1483.
204. Wakita N., Hara S. Selective mono-acylation of 1,2- and 1,3-diols using (α,α -difluoroalkyl)amines. *Tetrahedron*. **2010**, 66, 7939-7945.
205. Onomura O., Arimoto H., Matsumura Y., Demizu Y. Asymmetric oxidation of 1,2-diols using N-bromosuccinimide in the presence of chiral copper catalyst. *Tetrahedron Letters*. **2007**, 48, 8668-8672.
206. Demizu Y., Matsumoto K., Onomura O., Matsumura Y. Copper complex catalyzed asymmetric monosulfonylation of *meso-vic*-diols. *Tetrahedron Letters*. **2007**, 48, 7605-7609.
207. Csaba Bencze L., Paizs C., Ioana Toşa M., Dan Irimie F. Sequential use of regio- and stereoselective lipases for the efficient kinetic resolution of racemic 1-(5-phenylfuran-2-yl)ethane-1,2-diols. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2011**, 22, 675-683.
208. Recuero V., Brieva R., Gotor V. Highly enantioselective transformations on 3,4-dihydroxytetrahydrofurans catalyzed by lipases. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2008**, 19, 1684-1688.
209. (a) Suemune H., Hasegawa A., Sakai K. Highly enantio- and diastereo-selective synthesis of C2-symmetric 3,5-cyclohexadiene-1,2-diol and D2-symmetric

Références bibliographiques

- cyclohexane-1,2,4,5-tetrol. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1995**, 6, 55-58. (b) Suemune H., Hizuka M., Kamashita T., Sakai K. Preparation of optically active γ -hydroxyethyl α , β -unsaturated γ -lactone using an enzymatic procedure. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1989**, 37, 1379-1381.
210. Bódai V., Orovecz O., Szakács G., Novák L., Poppe L. Kinetic resolution of trans-2-acetoxycycloalkan-1-ols by lipase-catalysed enantiomerically selective acylation. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2003**, 14, 2605-2612.
211. Deau E. Synthèse asymétrique de l'épi-jasmonate de méthyle et de son énantiomère (ent-épi-jasmonate de méthyle) par voie chimique et enzymatique. **2011**. *Thèse de Doctorat*. Université de La Rochelle, 87-109.
212. Horikawa T., Norimine Y., Tanaka M., Sakai K., Suemune H. Synthesis of Optically Active Bicyclo[3.3.0]octane Skeleton Using Transannular Reaction. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1998**, 46, 17-21.
213. Mancini I., Defant A., Guella G. Recent Synthesis of Marine Natural Products with Antibacterial Activities. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. **2007**, 6, 17-48.
214. Tang Y., Lee T., Lee H., Khosla C. Exploring the biosynthetic potential of bimodular aromatic polyketide synthases. *Tetrahedron*. **2004**, 60, 7659-7671.
215. Tardi P., Johnstone S., Harasym N., Xie S., Harasym T., Zisman N., Harvie P., Bermudes D., Mayer L. In vivo maintenance of synergistic cytarabine:daunorubicin ratios greatly enhances therapeutic efficacy. *Leukemia Research*. **2009**, 33, 129-139.
216. Bister B., Bischoff D., Ströbele M., Riedlinger J., Reicke A., Wolter F., Bull A., Zähler H., Fiedler H.P., Süßmuth R. byssomicin C—A Polycyclic Antibiotic from a Marine Verrucosipora Strain as an Inhibitor of the p-Aminobenzoic Acid/Tetrahydrofolate Biosynthesis Pathway. *Angewandte Chemie International Edition*. **2004**, 43, 2574-2576.
217. Van Dolah F.M. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspective*. **2000**, 108, 133-141
218. Paterson I., Britton R., Delgado O., Gardner N., Meyer A., Naylor G., Poullennec K. Total synthesis of (-)-dictyostatin, a microtubule-stabilising anticancer macrolide of marine sponge origin. *Tetrahedron*. **2010**, 66, 6534-6545.
219. Oh H.S., Kang H.Y. Total synthesis of neomethymycin and novamethymycin. *Tetrahedron*. **2010**, 66, 4307-4317.
220. Domon L., Vogeleisen F., Uguen D. A convenient preparation of elements of the stereotriade. *Tetrahedron Letters*. **1996**, 37, 2773-2776.
221. Wang B., Liu J., Tang X., Cheng C., Gu J., Dai L., Yu H. Enzymatic synthesis of (S)-glutaric acid monoesters aided by molecular docking. *Tetrahedron Letters*. **2010**, 51, 309-312.

Références bibliographiques

222. Pollard M., Beisson F., Li Y., Ohlrogge J. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science*. **2008**, 13, 236-246.
223. Borreguero I., Carvalho C., Cabral J., Sinisterra J., Alcántara A. Enantioselective properties of *Fusarium solani* pisi cutinase on transesterification of acyclic diols: activity and stability evaluation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2001**, 11, 613-622.
224. Jacob J. *Traité élémentaire de chimie expérimentale et appliquée*. **1867**. Ed. par l'auteur, Paris, 684-686.

Etude de résolutions enzymatiques catalysées par des lipases sous irradiation micro-onde

Résumé :

La demande en composés chiraux est en plein essor ces dernières années. Pour accéder à leur synthèse, la biocatalyse, couplée à l'irradiation pourrait être une méthode innovante. Il existe en effet de nombreux cas dans la littérature où l'utilisation de micro-onde semble avoir un effet activateur sur l'efficacité enzymatique. Cependant, l'effet de l'irradiation micro-onde est mal compris et controversé. Le but de cette thèse était d'étudier l'impact de l'irradiation micro-onde sur des lipases, immobilisées ou non, en étudiant différentes réactions modèles, allant de la résolution d'alcools secondaires linéaires simples à la résolution de polyols complexes, et alcools polyfonctionnalisés, par comparaison entre chauffage sous irradiation micro-onde (en conditions drastiques ou non) au chauffage classique. L'étude de l'irradiation micro-onde sur la stabilité enzymatique et sur paramètres intrinsèques de l'enzyme après modification des paramètres réactionnels a permis de mettre en évidence un rôle indéniable de l'irradiation micro-onde sur l'efficacité des réactions enzymatiques. Il a été possible d'une part de diminuer de façon importante les temps réactionnels, comparé au chauffage traditionnel, et d'autre part de contrôler efficacement l'énantiopréférence et la sélectivité de la lipase pour l'obtention de molécules d'intérêt. Par des procédés innovants, l'impact de la puissance d'irradiation a été montré comme hautement dépendant du modèle réactionnel étudié. En optimisant les conditions réactionnelles pour obtenir les meilleures sélectivités et activités enzymatique sous irradiation micro-onde, la synthèse de α -hydroxyamides chiraux et de polyols parfaitement résolus a pu être entreprise de façon rapide, propre, tout en respectant les principes de chimie verte.

Mots clés : résolution enzymatique, lipase, irradiation micro-onde, mandélate de méthyle, polyol, diols cycliques homochiraux, triol.

Study of enzymatic resolutions catalyzed by lipases under microwave irradiation

Summary:

Chiral molecules demand is booming in recent years. Biocatalyse under microwave irradiation is found to be an attractive way to synthesise these molecules. Indeed, in the literature, some cases show an activation effect on the enzymatic efficiency by microwave irradiation, compared to classical heating. However, the effect of microwave irradiation is not well understood and controversial. The aim of his PhD was to study the impact of the microwave irradiation on some lipases, immobilized or not. Different model reactions were studied from secondary linear alcohol resolution, to the resolution of more complex polyols or polyfunctionalized secondary alcohols comparing the microwave heating (in drastic conditions or not) to the classical heating. Studying the enzymatic stability and intrinsic parameters after modifying the reaction parameters, we observed a clearly microwave effect on the efficiency of the enzymatic resolutions. Using microwave heating, it could be possible to decrease, in an important way, the reaction time, compared to the classical heating and to control the énantiopréférence of the lipase to efficiently obtain chiral product. Trough innovative processes, the impact of the irradiation has been studied and it depends on the model reaction.

Optimizing the conditions to obtain the best enzyme selectivities and activities under microwave irradiation, we could synthesise chiral α -hydroxyamides and polyols, in a rapid, clean way, respecting the principles of green chemistry.

Key words: Enzymatic resolution, lipase, microwave irradiation, methyl mandelate, polyol, homochiral cyclic diols, triol



Laboratoire LIENSs (Littoral Environnement et Sociétés)

UMR 6250 CNRS

Avenue Michel Crépeau – Bâtiment Marie Curie

17042 LA ROCHELLE CEDEX 1